



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

DENGUE E CHIKUNGUNYA:
ARBOVIROSES EMERGENTES EM ANGOLA

Nuno Miguel da Silva Marques

TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL
ESPECIALIDADE EM PATOLOGIA E CLÍNICA DAS DOENÇAS TROPICAIS

(JUNHO, 2017)



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

DENGUE E CHIKUNGUNYA: ARBOVIROSES
EMERGENTES EM ANGOLA

Autor: Nuno Miguel da Silva Marques

Orientador: Professor Doutor Jorge Seixas

Professor Auxiliar da Unidade da Clínica das Doenças Tropicais

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Professor Doutor Filomeno Fortes

Professor Associado da Faculdade de Medicina,

Universidade Agostinho Neto, Luanda, Angola

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Doutor em Medicina Tropical

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA TESE

Apresentações em Jornadas Científicas sob a forma de comunicação oral

1. Marques, N., Fortes, F. & Atouguia, J. 2012. *Arboviroses como causa de síndrome febril aguda na província do Huambo, Angola*. III Jornada Científica do IHMT. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.
2. Marques, N., Fortes, F., Atouguia, J. & Seixas, J. 2015. *Caracterização de um trabalho de campo de avaliação da síndrome febril suspeita de malária por testes de diagnóstico rápido (TDR) nas províncias do Huambo e Benguela, Angola*. 6^{as} Jornadas Científicas do IHMT. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.

Apresentações em Jornadas Científicas sob a forma de cartaz

1. Marques, N., Fortes, F. & Atouguia, J. 2013. *Aplicação de testes de diagnóstico rápido (TDR) na investigação etiológica da síndrome febril em zona endémica de malária (província do Huambo, Angola)*. 4^{as} Jornadas Científicas do IHMT. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.¹

¹ Por vontade do autor, esta tese segue a grafia anterior ao novo Acordo Ortográfico de 1990.

Agradecimentos

*Para a Amélinha,
Que vive inquieta com
O meu fascínio por África*

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste percurso de aprendizagem, mas também de esforço e de sacrifício recebi muitas palavras de apreço por parte de amigos e conhecidos. A todos eles estou imensamente agradecido.

Existem poucas coisas que superam o sentimento de gratidão e a dádiva de carinho por parte dos doentes, sobretudo dos mais fragilizados (a todos os níveis). Aos doentes incluídos neste estudo deixo o meu melhor reconhecimento.

À minha “escola” e aos meus “mestres” da lusa Atenas devo muito da minha prática clínica pelo que não posso deixar de agradecer ao Sr. Professor Doutor Saraiva da Cunha que sempre me incentivou e impulsionou para a área da Medicina Tropical.

Foi de facto, nesta área de estudo, que tive a oportunidade de privar com grandes médicos tropicalistas e dos quais recebi, para além de amizade, muitos ensinamentos. Deste modo, quero deixar expresso o meu reconhecimento ao Sr. Professor Doutor Jorge Seixas, orientador da minha formação doutoral, bem como ao Sr. Professor Doutor Jorge Atouguia e ao Professor Kamal Mansinho.

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio do Sr. Professor Doutor Filomeno Fortes, que gentilmente aceitou o desafio de co-orientar a minha formação doutoral. A sua acção motriz foi fundamental para a concretização deste estudo.

Em Angola tive o privilégio de conviver com profissionais de diferentes áreas e com os quais trabalhei com apreço. Agradeço todo o apoio e a amizade recebida da Doutora Elsa Fortes, do técnico Paulo Pulapula, do Dr. Lelo Zola, do Dr. Rafael Dimbo, do Dr. Nilton Saraiva e do Dr. Kinanga Kiaco.

No Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa contei com a ajuda verdadeiramente preciosa e essencial do Sr. Professor Doutor Ricardo Parreira e das técnicas Ângela Mendes e Ana Reis. Reconheço e agradeço toda a disponibilidade e ajuda técnica no processamento das amostras biológicas por técnicas de biologia molecular.

À Professora Doutora M^a Emília Nogueira e à Professora Doutora Ana Cristina Rosa do Departamento de Matemática da Universidade de Coimbra agradeço todo o apoio técnico na análise estatística deste trabalho. Não esqueço o empenho, a dedicação e a disponibilidade sempre presentes e que foram essenciais para a interpretação dos resultados obtidos.

Finalizo, dirigindo umas palavras para aqueles que me amam incondicionalmente:

- Aos meus pais que sempre me incutiram o espírito de dedicação, sacrifício e de procura de conhecimento;
- À Amélinha, minha companheira, que tem estado sempre presente, mesmo nas minhas “longas” ausências por motivos profissionais.

A todos bem-haja!

RESUMO

Nas últimas décadas tem-se assistido a uma redução do número de casos de malária em muitos países da África Subsariana. No entanto, o sobrediagnóstico de malária em zonas endémicas é frequente.

É desconhecida a relevância clínica das arboviroses no diagnóstico diferencial da malária em Angola. Historicamente a principal arbovirose descrita em Angola tem sido a febre amarela. No entanto, existiu evidência de circulação de outros arbovírus como o vírus chikungunya durante o período colonial. Após a independência do país, que ocorreu em 1975, foram registados em vários países casos esporádicos de dengue importados de Angola. Deste modo, até 2012, o desconhecimento sobre a prevalência de arboviroses, como dengue e chikungunya era uma realidade.

Foi realizado um estudo observacional e transversal com o objectivo de identificar a presença do vírus dengue e do vírus chikungunya. Incluíram-se doentes com síndrome febril (temperatura corporal $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ à admissão e/ou história de febre) e com clínica compatível com malária. Foram aplicados testes de diagnóstico rápido (TDR) [SD BIOLINE®], que são ensaios imunocromatográficos para detecção de: Ag NS1 e anticorpos IgG / IgM contra o vírus dengue; Ig M contra o vírus chikungunya; Ag HRP-II-P.f e pLDH-P.v de *Plasmodium* spp. Foram ainda colhidas amostras para realização de técnicas de biologia molecular (PCR ou RT-PCR) para *Plasmodium* spp., dengue e chikungunya.

O estudo decorreu em duas fases, a primeira, de Fevereiro a Abril de 2012, na província do Huambo e a segunda, de Maio a Junho de 2015, na província de Benguela, tendo sido incluídos um total de 542 doentes. Na primeira fase incluíram 242 doentes, maioritariamente do sexo feminino (59,9%). A média de idades foi de 16 anos. A clínica mais frequente foi a respiratória, nomeadamente tosse (60,7%) e corrimento nasal (48,3%) seguida das queixas algicas, cefaleias (40,1%), dores abdominais (36,4%), artralgias (33,9%) e mialgias (30,6%). As taxas de positividade do TDR foram as seguintes: malária (2,1%), chikungunya (1,7%) e dengue (0,8%). Verificou-se um caso de positividade concomitante para dengue (Ag NS1+) e chikungunya. Na segunda fase foram incluídos 300 doentes, também maioritariamente do sexo feminino (61%). A média de idades foi de 19 anos. A clínica mais frequente foi a algica, cefaleias (53%), mialgias (45%), artralgias (43,3%), dores abdominais (38,3%) seguida da respiratória, tosse (26,3%) e corrimento nasal (16,3%). As taxas de positividade do TDR foram as seguintes: malária (36,7%), chikungunya (18,3%) e dengue (3,3%). Verificaram-se 28 casos de positividade concomitante para malária e chikungunya e 4 para malária e dengue (1 com Ag NS1+ e 3 com IgM+). Nesta segunda fase foi ainda identificada por RT-PCR uma sequência genómica do vírus chikungunya que revelou uma elevada identidade com uma estirpe circulante nos Camarões em 2006.

Este estudo foi pioneiro na investigação recente de arbovírus em Angola, documentando a sua circulação, assim como também possibilitou, pela primeira vez, a aplicação em larga escala de TDR para dengue e chikungunya neste país.

Palavras-chave: chikungunya, dengue, malária, testes de diagnóstico rápido, Angola.

ABSTRACT

In recent decades, there has been a reduction in the number of malaria cases in many sub-Saharan African countries. However, the overdiagnosis of malaria in endemic areas is frequent.

The clinical relevance of arboviruses in the differential diagnosis of malaria in Angola is unknown. Historically the main arbovirolosis described in Angola has been Yellow Fever. However, there was evidence of circulation of other arboviruses such as the Chikungunya virus during the colonial period. After the country's independence, which occurred in 1975, sporadic dengue cases imported from Angola were registered in several countries. Thus, until 2012, the lack of knowledge about the prevalence of arboviruses, such as Dengue and Chikungunya, was a reality.

An observational and cross - sectional study was carried out to identify the presence of Dengue virus and Chikungunya virus. Patients with febrile syndrome (body temperature at admission ≥ 37.5 ° C and / or history of fever) and clinically compatible with malaria were included. Rapid diagnostic tests (TDR) [SD BIOLINE®], which are immunochromatographic assays for the detection of: Ag NS1 and IgG / IgM antibodies against Dengue virus have been applied; Ig M against the Chikungunya virus; Ag HRP-II-P.f and pLDH-P.v from *Plasmodium* spp. Biological samples were also collected for molecular biology techniques (PCR or RT-PCR) for *Plasmodium* spp., Dengue and Chikungunya.

The study was conducted in two phases, the first from February to April 2012 in Huambo province and the second from May to June 2015 in Benguela province, with a total of 542 patients. In the first phase 242 patients were included, mostly female (59.9%). The average age was 16 years. The most common symptoms were respiratory such as cough (60.7%) and nasal discharge (48.3%) followed by painful complaints, headache (40.1%), abdominal pain (36.4%), arthralgia (33 , 9%) and myalgias (30.6%). The rates of positive TDR were as follows: malaria (2.1%), Chikungunya (1.7%) and Dengue (0.8%). There was a case of concomitant positivity for Dengue (Ag NS1 +) and Chikungunya. In the second phase 300 patients were included, also mostly female (61%). The average age was 19 years. The most frequent clinic complaints were headaches (53%), myalgias (45%), arthralgia (43.3%), abdominal pains (38.3%) followed by cough (26.3%) and runny nose (16.3%). The rates of positive TDR were as follows: malaria (36.7%), Chikungunya (18.3%) and Dengue fever (3.3%). There were 28 cases of concomitant positivity for malaria and Chikungunya and 4 cases for malaria and Dengue (1 with Ag NS1 + and 3 with IgM +). In this second phase a Chikungunya genomic sequence was also identified by RT-PCR which revealed a high identity with a circulating strain in Cameroon in 2006.

This study was relevant for the recent investigation of arbovirus in Angola, documenting its circulation, as well as for allowing for the first time the large-scale application of TDR to Dengue and Chikungunya in this country.

Key words: Chikungunya, Dengue, malaria, rapid diagnostic tests, Angola.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Caracterização geral da temática de estudo: “Arboviroses”	1
1.2. Caracterização geral da área de estudo - “Angola”, com contextualização da relevância do tema “Arboviroses” até à data do primeiro trabalho de campo (2012)	3
1.3. Princípios gerais dos testes de diagnóstico rápido para malária e para as principais arboviroses disponíveis à data do início do estudo (2012) na avaliação do doente febril em zonas endémicas de malária	9
1.4. Delimitação do tema de estudo	11
1.4.1. Dengue: caracterização geral	12
1.4.2. Chikungunya: caracterização geral	17
1.4.3. Co-infecções de vários arbovírus com ou sem co-infecção com <i>Plasmodium</i> spp.	21
1.5. Fundamentação e Objectivos do trabalho de investigação	22
2. Material e Métodos	26
2.1. Tipo de estudo	26
2.2. Implementação do estudo	26
2.3. Áreas geográficas específicas do estudo	27
2.3.1. Província do Huambo (Fase 1)	27
2.3.2. Província de Benguela (Fase 2)	28
2.4. Processo de amostragem	29
2.5. Instrumentos de colheita de dados	31
2.5.1. Inquérito clínico e epidemiológico	31
2.5.2. Avaliação clínica	32
2.6. Recolha, armazenamento e processamento laboratorial de amostras biológicas	33
2.7. Análise estatística dos dados	39
2.8. Considerações éticas e legais	40
2.9. Fluxograma de actuação	41
3. Resultados	42
3.1. Província do Huambo (Fase 1)	42
3.1.1. Caracterização da amostra	42

3.1.2. Caracterização da subamostra com TDR positivo para malária	55
3.1.3. Caracterização da subamostra com TDR positivo para chikungunya	57
3.1.4. Caracterização da subamostra com TDR positivo para dengue	58
3.1.5. Caracterização das subamostras com prováveis co-infecções	59
3.2. Província de Benguela (Fase 2)	59
3.2.1. Caracterização da amostra	59
3.2.2. Caracterização da amostra subdividida geograficamente entre o litoral e o interior da província	74
3.2.3. Caracterização da subamostra com TDR positivo para malária	86
3.2.4. Caracterização da subamostra com TDR positivo para chikungunya	91
3.2.5. Caracterização da subamostra com TDR positivo para dengue	93
3.2.6. Caracterização das subamostras com prováveis co-infecções	95
3.3. Caracterização resumida de ambas as províncias	97
4. Discussão e Conclusões	100
4.1. Circulação de dengue e chikungunya em território angolano	100
4.2. Considerações sobre a estirpe identificada do vírus chikungunya	105
4.3. Factores populacionais potencialmente facilitadores da expansão das arboviroses em Angola	106
4.4. Considerações clínicas e laboratoriais	108
4.5. Identificação de factores de risco	110
4.6. Identificação de prováveis co-infecções	113
4.7. Limitações do estudo	114
4.8. Recomendação de estratégias de acção e/ou identificação de áreas relevantes para futuras pesquisas	115
4.9. Considerações finais com referência a outros arbovírus em circulação em Angola	117
5. Referências bibliográficas	120
6. Anexos	134

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ag: Antígeno

ARN: Ácido ribonucleico

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CHIK: Chikungunya

CYD-TDV: *Chimeric yellow fever virus-dengue virus - tetravalente dengue vaccine*

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

HRP2: Proteína rica em histidina 2 produzida por *Plasmodium falciparum*

IC: Intervalo de confiança

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

NS: *nonstructural protein*

OR: Razão de chances (*odds ratio*)

p. ex.: Por exemplo

P. f: *Plasmodium falciparum*

P. v: *Plasmodium vivax*

p: Probabilidade de significância

PCR: Reacção em cadeia da polimerase

RT-PCR: Reacção da transcriptase reversa seguida de reacção em cadeia da polimerase

SAS-JMP: *Statistical Analysis System - John`s Macintosh Project*

spp.: espécies

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

TDR: teste de diagnóstico rápido

UTR: *untranslated region*

VIH/SIDA: Vírus da imunodeficiência humana / síndrome da imunodeficiência adquirida

UNIDADES DE MEDIDA

°C: Graus Celcius

g/dl: Gramas por decilitro

Km: Quilómetros

Km²: Quilómetros quadrados

ml: Mililitros

mm³: milímetros cúbicos

U/L: unidades por litro

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização geral da temática de estudo: “Arboviroses”

O termo arboviroses não possui valor taxonómico, aplicando-se a todos as viroses transmitidas por vectores artrópodes. A Organização Mundial de Saúde refere que são doenças causadas por vírus mantidos na natureza através da transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis a artrópodes hematófagos, ou por transmissão transovariana em artrópodes (*World Health Organization*, 1967). Esta última particularidade assume importância epidemiológica, uma vez que os artrópodes podem ser simultaneamente vectores e hospedeiros. Deste modo, o conceito de vírus transmitidos por artrópodes, que foi introduzido pela primeira vez, em 1942, para descrever um grupo de vírus de animais como causadores de encefalite em humanos, assume na realidade um carácter epidemiológico e ecológico (*World Health Organization*, 1967).

Genericamente, existem mais de cinco centenas de arbovírus com distribuição geográfica global. Cerca de 150 espécies de vírus podem causar doença em humanos, sendo que as de maior impacto para a saúde humana encontram-se em regiões tropicais e subtropicais (Smith et al., 2009). Todos possuem genoma de ácido ribonucleico e a grande maioria pertence a quatro famílias víricas: *Togaviridae* (p. ex. vírus chikungunya e vírus o'nyong-nyong, ambos do género *Alphavirus*), *Flaviviridae* (p. ex. vírus da febre amarela, vírus dengue, vírus do Nilo Ocidental, vírus Zika e vírus da encefalite japonesa; todos pertencentes ao género *Flavivirus*), *Bunyaviridae* (p. ex. vírus Oropouche do género *Orthobunyavirus*, vírus da febre hemorrágica Crimeia – Congo do género *Nairovirus*, vírus da febre do Vale do Rift e vírus Toscana, ambos do género *Phlebovirus*) e *Reoviridae* (p. ex. vírus da febre da carraça do Colorado do género *Coltivirus* e vírus Orungo do género *Orbivirus*).

A cadeia de transmissão assenta em três pilares, nomeadamente na presença de vectores [mosquitos (anofelíneos e culicíneos), flebótomos, carraças (ixodídeos e argasídeos) e culicídeos], de hospedeiros vertebrados (reservatório e/ou incidental e/ou propagador) e de condições ambientais propícias (p. ex. pluviosidade, temperatura, humidade e actividades humanas). Acresce-se ainda a possibilidade de existência de dois ciclos de transmissão, nomeadamente: *animal – artrópode – Homem*, em que o animal é o reservatório e o Homem infecta-se de modo incidental e/ou *Homem – artrópode –*

Homem, em que o reservatório tanto pode ser o Homem como o artrópode, podendo ainda ocorrer transmissão transovariana no insecto em alguns casos. Contudo, são possíveis entre outras vias de transmissão: a transfusional (p. ex. vírus do Nilo Ocidental, vírus dengue, vírus do Rio Ross, vírus Zika), a ingestão de leite de caprinos infectados e a *per cutem* (p. ex. vírus da encefalite europeia transmitida por carraças), a materno-fetal (p. ex. vírus dengue, vírus do Nilo Ocidental, vírus chikungunya e vírus Zika), a sexual (p. ex. vírus Zika) e a transplantação de órgãos (p. ex. vírus do Nilo Ocidental).

O espectro clínico em humanos pode ser bastante abrangente, desde uma infecção assintomática até à manifestação de uma ou mais das seguintes síndromas: doença sistémica febril (por vezes apenas com sintomatologia pseudogripal), febre hemorrágica, encefalite, doença causadora de poliartralgias e/ou poliartrites e doença exantemática febril. Como mencionado previamente, a maioria dos arbovírus possui uma distribuição geográfica preponderante em regiões de clima tropical e/ou subtropical, onde a malária assume um papel de destaque na morbidade e mortalidade das populações locais. Facilmente se compreende que a clínica das arboviroses pode ser muito similar à da malária, pelo que o recurso a técnicas laboratoriais é essencial para um diagnóstico adequado. Tendo em conta que a maioria destas regiões geográficas possui infraestruturas de saúde com condições técnicas precárias e com recursos humanos insuficientes, o diagnóstico diferencial da síndrome febril suspeita de malária representa o maior desafio clínico, espelhando categoricamente as dificuldades e constrangimentos de grande parte dos sistemas nacionais de saúde dos países em regiões de clima tropical e/ou subtropical. O diagnóstico das arboviroses baseia-se em métodos serológicos ou de detecção vírica. Este último método, dificilmente será acessível na maioria das zonas endémicas em África, pela exigência de manipulação em concordância com as orientações de biossegurança para o vírus em causa, em laboratórios microbiológicos e biomédicos. Deste modo, os métodos serológicos arrogam um papel significativo, nomeadamente os testes de diagnóstico rápido (TDR), pela sua facilidade de execução e interpretação.

A prevenção engloba a imunização, quando existente (p. ex. vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite europeia transmitida por carraças); o controlo vectorial; a implementação de programas de vigilância (entomológica, clínica e

estudos de seroprevalência); e a educação das comunidades, nomeadamente para a adopção de medidas de protecção individual.

Na última década assistiu-se à expansão geográfica do vírus dengue, do vírus do Nilo Ocidental, do vírus chikungunya e do vírus Zika, o que reflecte o imenso e preocupante potencial das arboviroses como doenças emergentes e re-emergentes. Contribuem para esta realidade os seguintes factores decorrentes essencialmente dos fenómenos da globalização: a expansão geográfica destes vírus mediada pela transportação humana e/ou amplificada pelos animais domesticados e/ou animais sinantrópicos, o incremento da mobilidade humana e dos animais (viagens, fluxos migratórios e do comércio global), a desflorestação, a urbanização e o acréscimo da população humana em regiões de clima tropical e/ou subtropical. O aquecimento global auxilia no aumento da distribuição dos vectores possibilitando a sua propagação para regiões de clima temperado. Destaca-se ainda a capacidade de alguns arbovírus poderem adoptar, quer ciclos de transmissão antroponóticos urbanos e peridomiciliares envolvendo vectores antropofílicos altamente eficientes como os mosquitos *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, quer ciclos enzoóticos peridomiciliares, envolvendo populações urbanas de mosquitos ornitofílicos do género *Culex* (Weaver e Reisen, 2010). Pelo exposto, trata-se de um tema extenso, complexo, actual e desafiante.

1.2. Caracterização geral da área de estudo - “Angola”, com contextualização da relevância do tema “Arboviroses” até à data do primeiro trabalho de campo (2012)

A República de Angola localiza-se na costa ocidental da África austral, a sul do Equador, entre os paralelos 4° 22' e 18° 02' e estende-se desde a foz do rio Congo (também conhecido como rio Zaire), a norte, até à foz do rio Cunene, a sul (Figura 1). Possui uma configuração geográfica sensivelmente quadrada, sendo limitada, a norte, pela República Democrática do Congo, a leste, pela República Democrática do Congo e pela Zâmbia, a sul, pela Namíbia e a oeste, pelo Oceano Atlântico. Engloba ainda, o enclave da província de Cabinda, limitada ao norte pela República do Congo, a leste e ao sul pela república Democrática do Congo e a oeste pelo Oceano Atlântico. Encontra-se, administrativamente dividida em 18 províncias, 162 municípios e 559 comunas, e

Introdução

possui uma área de 1 246 700 Km², sendo o sétimo país africano de maior dimensão. A capital é a cidade de Luanda, cuja fundação data de 1576. Foi uma colónia portuguesa e constitui um estado soberano desde 11 de Novembro de 1975. Pouco depois da independência, o país entrou num período de guerra civil violenta e intermitente que se estendeu por 27 anos.

No ano de 2011, a população total foi estimada em 19,6 milhões de habitantes (*United Nations*, 2011). No entanto, o recenseamento geral da população e da habitação de Angola em 2014 revelou uma população total de 25 789 024 habitantes (Instituto Nacional de Estatística, 2016). Pese embora o português seja a língua oficial de Angola, existem três grupos etnolinguísticos principais: ovimbundu (37%), ambundu (25%) e bacongo (13%). A larga maioria da população expressa-se em português (71%), seguido de umbundo (23%), quicongo (8%) e quimbundo (8%) (Instituto Nacional de Estatística, 2016).

O país tem uma faixa costeira árida, que se estende desde a Namíbia até Luanda, um planalto interior húmido, uma savana seca no interior sul e sudeste e floresta tropical no norte e em Cabinda. As terras altas do interior têm um clima suave com uma estação das chuvas de Setembro a Abril, seguida por uma estação seca (“cacimbo”), mais fria, de Maio a Agosto. As regiões do norte e Cabinda têm chuvas ao longo de quase todo o ano. O clima é fortemente influenciado por um conjunto de factores, dos quais se destacam a latitude, a altitude, a orografia, a corrente marítima de Benguela e as bacias hidrográficas dos rios Zaire, Zambeze, Cuanza, Cubango, Cuando e Cunene.



Figura 1: Mapa de Angola (Fonte: Nações Unidas, Mapa n° 3727 Rev. 4, Agosto 2008).

Em termos epidemiológicos a malária representa a principal causa de morte e de doença, sendo responsável por 35% da demanda de cuidados curativos, de 20% de internamentos hospitalares, 40% das mortes perinatais e 25% da mortalidade materna (Programa Nacional do Controlo da Malária, 2010). É endêmica nas 18 províncias, incluindo a província de Luanda, sendo hiperendêmica no Norte (Cabinda, Uíge,

Malanje, Cuanza Norte, Lunda Norte e Lunda Sul). Nas restantes áreas, a transmissão é moderada (mesoendêmica). *Plasmodium falciparum* é responsável por cerca de 92% dos casos de malária e *Plasmodium vivax* por 5% a 7% (Cosep Consultoria, Consaúde e ICF Macro, 2011). Segundo um estudo concretizado no período de 17 a 31 de Março de 2008 em 30 unidades de saúde da província de Luanda e que avaliou 864 pacientes febris (59,1% com idade inferior a 5 anos), a taxa de positividade dos TDR por imunocromatografia para malária foi de 4,9% (sendo que todos foram tratados com arteméter/lumefantrina) e a taxa de positividade da microscopia óptica foi de 3,6% (Thwing et al., 2009). Acresce-se a existência de evidência de uma diminuição significativa da proporção de febres associadas a parasitemia por *Plasmodium falciparum* no período anterior a 2000 e posterior a 2001 (44% versus 22%) em estudos realizados em alguns países da África subsariana (D'Acremont et al., 2010). Estes dados são relevantes, uma vez que alertam para a necessidade de existência de métodos laboratoriais para o diagnóstico diferencial da malária. Contudo, o sobrediagnóstico de malária em zonas endémicas é frequente e pode conduzir a problemas graves na gestão do paciente febril, bem como levar à rotura do armazenamento de antipalúdicos por excesso de consumo inadequado. De facto, segundo um estudo conduzido em 2007, em 33 unidades de saúde da província do Huambo, somente 49% dos tratamentos prescritos contra a malária foram considerados adequados e apenas 30,7% dos doentes com suspeita clínica de malária realizaram testes laboratoriais para confirmação diagnóstica (Rowe et al., 2009).

É desconhecida a relevância clínica das arboviroses no diagnóstico diferencial da malária em Angola. Relativamente a outros países limítrofes de Angola, os dados também são escassos. Porém, o vírus chikungunya têm reemergido como causador de surtos epidémicos na República Democrática do Congo (Muyembe-Tamfum et al., 2003; Pastorino et al., 2004) e na República do Congo (Kelvin, 2011).

A principal arbovirose descrita em Angola tem sido a febre amarela. Historicamente, existem alusões datadas de 1595 do que se supõe ter sido a primeira epidemia de febre amarela em Angola, tendo incidindo especialmente sobre Luanda e Massangano (Cambournac et al., 1955). Outras referências comprovam outra epidemia de febre amarela que cursou entre 1860 e 1872 em Luanda e outras cidades costeiras (Ribeiro, 1973). Durante o período colonial realizaram-se ainda dois inquéritos serológicos para a

febre amarela. O primeiro, levado a cabo, em 1934, em povoações costeiras e do Norte, incluiu 949 soros, dos quais apenas 11 (1,16%) apresentaram um resultado positivo das provas de protecção, termo utilizado à época para denominar a detecção de anticorpos IgG (Cambournac et al., 1955). O segundo inquérito foi conduzido nos anos de 1952 e 1953, e envolveu 1549 soros, dos quais 1443 (93,16%) de crianças com idade inferior a 15 anos, tendo existido 38 (2,45%) com resultado positivo das provas de protecção. As localidades onde se verificaram casos de imunidade, encontram-se geograficamente distribuídas, segundo o actual mapa das províncias de Angola, da seguinte forma:

- Namibe, Huíla, Cunene e Cuando – Cubango (n=13);
- Malanje, Lunda Norte e Lunda Sul (n=9);
- Cabinda, Zaire e Uíge (n=8);
- Moxico (n=5);
- Huambo (n=3), especificamente em Caála (Cambournac et al., 1955).

No entanto, a documentação de circulação de outros arbovírus, em Angola, ficou pautada em estudos serológicos executados nas décadas de 1960 e 1970. Um estudo realizado, de Maio a Junho de 1960, em 492 indivíduos de 14 localidades dispersas de norte a sul do país, revelou a presença de anticorpos por reacções de inibição da hemaglutinação e de neutralização contra os seguintes arbovírus: vírus da febre amarela (n=42), vírus Zika (n=20), vírus chikungunya (n=8) e vírus do Nilo Ocidental (n=6), entre outros (Kokernot et al., 1965). Relativamente à distribuição geográfica dos casos reactivos para o vírus da febre amarela houve um claro predomínio pela região norte [província de Cabinda: Boco Zau (n=15) e cidade de Cabinda (n=7); e província do Uíge, em Maquela do Zombo (n=16) e Béu (n=2)]. Os outros dois casos verificaram-se no Lobito (província de Benguela) e no Luso (actual Luena, província do Moxico). Os anticorpos contra o vírus Zika foram identificados maioritariamente no Uíge, em Maquela do Zombo (n=3) e no Béu (n=9), seguido do Lobito (n=4), de Moçamedes, actualmente denominada de Namibe (n=3) e de Malanje (n=1). No que diz respeito ao vírus chikungunya, também se verificou uma preponderância na região Norte do país: Béu (n=2), Dundo, na província da Lunda Norte (n=2), Malanje (n=1), Caxito, na província do Bengo (n=2) e Catete, na província de Luanda (n=1). Finalmente, os anticorpos contra o vírus do Nilo Ocidental foram encontrados em Catete (n=4), cidade

de Cabinda (n=1) e Lobito (n=1). Neste estudo não foram colhidas amostras na cidade de Luanda. Outro estudo de seroprevalência utilizando as mesmas técnicas serológicas foi levado a cabo aquando de uma epidemia de febre amarela em Luanda, que decorreu de Janeiro a Março de 1971 e durante a qual foram oficialmente notificados 65 casos e 42 óbitos. Este inquérito serológico incluiu 589 amostras e revelou a presença do vírus chikungunya em 13,7% das amostras, para além do vírus da febre amarela. Ambos os vírus foram responsáveis por um surto de uma doença febril clinicamente sobreponível ao dengue, nos meses que antecederam e durante a epidemia de febre amarela de 1971 (Pinto e Filipe, 1973; Filipe e Pinto, 1973). Nestes estudos ficou documentado o isolamento de duas estirpes de chikungunya, uma proveniente de um soro humano e outra de um *pool* de mosquitos *Aedes aegypti* (Filipe e Pinto, 1973), bem como o isolamento de nove estirpes do vírus da febre amarela, todas antigenicamente semelhantes à estirpe Asibi (Pinto e Filipe, 1973). Relembre-se que a estirpe selvagem Asibi foi isolada a partir de soros humanos colhidos no Gana, em 1927, e possibilitou o desenvolvimento da estirpe vacinal que derivou desta estirpe selvagem (Lepinieć et al., 1994).

Após a independência de Angola, em 1975, não existem referências no que concerne a realização de outros estudos de seroprevalência de arbovírus. Contudo, ocorreu um surto epidémico de febre amarela em 1988 em Luanda com 37 casos (Vainio e Cutts, 1998) e foram reportados casos esporádicos de dengue importados de Angola em 1986 e no período de 1999 a 2002 (Bakker et al., 1996; Amarasinghe et al., 2011). Destaca-se ainda o isolamento da primeira amostra do serotipo 2 do vírus Dengue no Brasil, em Fevereiro de 1989, numa doente proveniente de Luanda (Vasconcelos et al., 1993). Pelo exposto, a realização de um estudo de seroprevalência de arboviroses em Angola, que permita conhecer, particularmente, a situação epidemiológica das infecções causadas pelos vírus chikungunya e dengue no início da segunda década do século XXI, reveste-se de um carácter premente. O diagnóstico diferencial da síndrome febril suspeita de malária constitui uma verdadeira *terra incognita*.

1.3. Princípios gerais dos testes de diagnóstico rápido para malária e para as principais arboviroses disponíveis à data do início do estudo (2012) na avaliação do doente febril em zonas endémicas de malária

Entre as várias medidas implementadas para minimizar o ónus da malária nas populações de zonas endémicas, assumem um papel de relevo a utilização das redes mosquiteiras impregnadas de insecticida, o tratamento combinado com derivados da artemisinina e o advento de novas técnicas diagnósticas, nomeadamente os TDR. De facto, estes testes são fáceis de interpretar e o resultado pode ser obtido em 5 a 20 minutos, pelo que a formação para a sua realização e interpretação é mínima e pouco onerosa. São ainda fáceis de transportar, o seu armazenamento não requer condições muito exigentes e a sua realização não está dependente de electricidade. Deste modo, detêm uma potencial mais-valia se aplicados em áreas remotas e desprovidas de equipamentos laboratoriais como a microscopia óptica, uma vez que poderão tornar o diagnóstico meramente clínico obsoleto.

Genericamente, os TDR baseiam-se na detecção de antígenos de microrganismos e apresentam-se na forma de tiras, cassetes ou cartões, que através de processos de imunocromatografia produzem linhas visíveis aquando da presença desses antígenos numa pequena quantidade de sangue recolhida (5 a 15 microlitros).

Relativamente à malária, os antígenos detectados com os TDR podem ser a proteína rica em histidina 2 produzida por *Plasmodium falciparum* (HRP2), a enzima desidrogenase láctica específica de *Plasmodium* e a enzima aldolase, sendo que estas duas últimas enzimas são antígenos pan-maláricos, ou seja para as quatro principais espécies de *Plasmodium* que são patogénicas para o Homem. Alguns ensaios clínicos revelaram uma sensibilidade superior a 95% nos TDR que detectam a HRP2, mas os resultados dependem do teste utilizado, uma vez que existem múltiplas marcas comerciais disponíveis no mercado. Para espécies de *Plasmodium* não *falciparum*, a sensibilidade destes testes pode ser baixa (65% a 76%) sobretudo aquando de parasitémias baixas (Wongsrichanalai et al., 2007). Realça-se que parasitémias elevadas de *Plasmodium falciparum* podem ser causa de falsos positivos em TDR para *Plasmodium vivax* por reactividade cruzada com anticorpos anti-desidrogenase láctica *Plasmodium vivax* (Wilson, 2012). Os falsos negativos na detecção da HRP2 podem

surgir na presença de baixas parasitémias, na inexistência da HRP2 no *Plasmodium falciparum* e nos casos de um efeito pró-zona devido a um excesso de anticorpos contra os antígenos alvo dos TDR, o que diminui a detecção desses antígenos pelo sistema imunocromatográfico (Luchavez et al., 2011; Wilson, 2012; Cheng et al., 2014). Por outro lado, também poderão ocorrer falsos positivos na detecção da HRP2 na presença de infecção por *Schistosoma mekongi* e de factor reumatoide e/ou autoanticorpos (Wilson, 2012). Salienta-se ainda que não é possível a quantificação da parasitemia com os TDR e que os que detectam a HRP2 não são aconselháveis para a monitorização terapêutica, pois esta proteína pode persistir no sangue até 30 dias após o tratamento eficaz (Wilson, 2012). Outro facto relevante diz respeito aos portadores assintomáticos de malária que poderão permanecer sem ser diagnosticados com os TDR pelas baixas parasitémias, contribuindo deste modo para a propagação da doença. Também deve ser enfatizado que em regiões com prevalência até 62% de malária por *Plasmodium falciparum* a aplicação dos TDR é custo-efectiva quando comparada com o tratamento presuntivo, assumindo-se que os prescritores decidam de acordo com o resultado do teste (Shillcutt et al., 2008). Num estudo realizado no Uganda, em unidades básicas de saúde, a utilização de TDR para o diagnóstico de malária resultou numa redução de 38% da prescrição de antipalúdicos. Destacou-se ainda que essa redução foi menor em meio urbano e que cerca de 30% dos casos com resultado negativo receberam uma prescrição de antipalúdicos, sobretudo no grupo de crianças com idade inferior a 5 anos (Kyabayinze et al., 2010).

Uma vez excluída malária, por aplicação dos TDR e/ou por microscopia, existem poucas ferramentas diagnósticas em locais com poucos recursos, que permitam melhorar a avaliação do doente febril com relação às arboviroses.

A febre de dengue constitui um caso paradigmático da importância de um diagnóstico laboratorial célere e adequado à fase clínica da doença. A NS1 é uma glicoproteína da região não-estrutural que é essencial para a replicação do vírus da dengue. A detecção do antígeno (Ag) NS1 por um ensaio imunoenzimático, apresenta uma especificidade muito elevada (>95% na maioria dos estudos), pode ocorrer precocemente (24 horas após e até 9 dias após o início da sintomatologia), além de se verificar tanto nas infecções primárias (permanecendo durante uma média de 5 a 6 dias após início da sintomatologia) como nas secundárias (durante um período médio de 6 a 12 dias após

início da sintomatologia). Os anticorpos da classe IgM aparecem entre o 4º e o 8º dia após o início dos sintomas e os da classe IgG mais tardiamente. Numa infecção secundária, a detecção dos anticorpos IgM é mais precoce (nos primeiros 2 a 3 dias) e menos duradoura. A especificidade da IgM pode ser inferior à do antígeno NS1 sobretudo por reactividade cruzada com outros patógenos, nomeadamente o vírus chikungunya (Blacksell et al., 2011) ou com outros flavivírus incluindo o vírus da febre amarela e o vírus do Nilo Ocidental. Uma infecção secundária origina uma resposta anamnésica, geralmente entre o 4º e o 5º dia de doença, com incremento dos anticorpos IgG, que surgem muito mais precocemente do que numa infecção primária. Assim sendo, a melhor caracterização da fase clínica advém da utilização de um TDR que combina a detecção de antígeno NS1 e de anticorpos das classes IgM e IgG. Também existem TDR que detectam anticorpos da classe IgA, que poderão ter uma importância maior no diagnóstico das infecções secundárias, atendendo a uma taxa de detectabilidade superior desta imunoglobulina quando comparada com as infecções primárias (Blacksell, 2012).

No que concerne as infecções por vírus chikungunya, a utilização de TDR baseados na detecção de anticorpos da classe IgM é recente e os dados relativos ao seu desempenho foram escassos até à data do início deste estudo.

A contribuição dos TDR para uma abordagem sindrómica da síndrome febril em regiões de clima tropical e/ou subtropical deverá ser explorada e validada.

1.4. Delimitação do tema de estudo

A manifestação do interesse pela temática das arboviroses é fruto da experiência pessoal como infecciologista com prática em Medicina do Viajante e em Medicina Tropical. Realizou estágios opcionais em Medicina Tropical, aquando do 6º ano da licenciatura em Medicina, em Moçambique e no 4º ano da formação específica em Infecciologia, em Manaus, no Brasil. Na Amazónia teve oportunidade de observar e diagnosticar casos de febre de dengue e de febre de Oropouche. Aquando da epidemia de dengue em Cabo Verde, em 2009, integrou a primeira equipa médica portuguesa, em resposta a um pedido de ajuda internacional lançado pelo governo cabo-verdiano, facto muito enriquecedor, tanto a nível profissional como pessoal e que foi decisivo para o ingresso,

em 2011, num processo de formação doutoral no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. Investiu ainda no incremento de conhecimentos na abordagem clínica e laboratorial de doentes infectados por vírus dengue, frequentando um estágio clínico específico nesta entidade nosológica, no Hospital *Tan Tock Seng*, em Singapura. No entanto, este percurso de formação doutoral foi bastante longo com alguns contratempos inerentes à realização de trabalhos de campo em regiões tropicais e/ou subtropicais e a múltiplas vicissitudes incluindo alterações epidemiológicas das arboviroses no país de escolha para a investigação, Angola, e que serão exploradas no capítulo da discussão e conclusões.

Facilmente se compreende que perante um tema tão abrangente e complexo como são as arboviroses, houve necessidade de se optar pela circunscrição do estudo a um número restrito de arbovírus. A febre amarela, sendo prevenível por vacinação, só ressurgirá por diminuição da imunidade de grupo por lapso na cobertura vacinal das populações de países endémicos ou pela inexistência de campanhas de vacinação. A vacina contra a febre amarela foi descoberta em 1937 por Max Theiler (Theiler e Smith, 1937), motivo pelo qual recebeu o prémio Nobel da Medicina em 1951. Trata-se de uma vacina altamente imunogénica e que confere uma protecção sustentada, visto que uma dose é suficiente para adquirir uma imunidade vitalícia (Gotuzzo et al., 2013). Assim sendo, e em concordância com os factos explanados nas secções anteriores, é entendível que, em 2012, a escolha tenha recaído sobre dengue e chikungunya, duas arboviroses emergentes a nível global e cuja epidemiologia em Angola é desconhecida; de seguida, serão alvo de uma exposição sucinta. A contextualização cronológica dos conhecimentos é fundamental para uma adequada interpretação e análise deste projecto de investigação, que abrangeu dois trabalhos de campo, o primeiro realizado no ano de 2012 e um segundo em 2015.

1.4.1. Dengue: caracterização geral

A infecção por vírus dengue representa a arbovirose mais relevante a nível global, em termos da sua distribuição geográfica, morbidade e mortalidade. Em 2009, a Organização Mundial de Saúde estimou os casos de dengue, a nível mundial, em 50 a 100 milhões, revelando que a sua incidência aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos e

que cerca de 2,5 mil milhões de pessoas vivam em risco de adquirir a doença em zonas endémicas (*World Health Organization*, 2009).

Tradicionalmente as regiões endémicas tropicais e/ou subtropicais localizam-se entre uma latitude 30° Norte e 40° Sul, onde as condições ambientais são altamente propícias à transmissão por mosquitos *Aedes* spp (Nimmannitya, 2009). O *Aedes aegypti* é o vector mais eficiente, tem actividade diurna com preferência pelas primeiras horas do dia e pelo entardecer, habitualmente é pouco incomodativo, sendo a sua picada indolor, prefere ambientes peridomésticos e a sua capacidade de dispersão é em média de 100 a 500 metros. Outros mosquitos capazes de veicular o vírus dengue são, entre outros, o *Aedes albopictus*, o *Aedes polynesiensis* e o *Aedes* do complexo *scutellaris*. Em oposição ao vírus da febre amarela, que possui um ciclo bem sustentado de transmissão silvática, o vírus dengue tem preferência por um ciclo de transmissão urbano *Homem – mosquito – Homem*. Não obstante, foram identificados ciclos de transmissão silváticos do vírus dengue na África Ocidental e no Sudeste Asiático (Gubler, 2004). A transmissão transovárica do dengue está documentada mas a sua relevância epidemiológica ainda não foi estabelecida (Rosen et al., 1983).

A estrutura do vírus dengue é relativamente simples, constituída por partículas esféricas que englobam as proteínas estruturais do invólucro, da membrana e da cápside, bem como o genoma, que consiste de uma fita simples de ácido ribonucleico de polaridade positiva. Adicionalmente, existem glicoproteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), essenciais para a replicação do ácido ribonucleico viral.

O vírus dengue pertence ao género *Flavivirus* e possui quatro serotipos principais imunologicamente distintos (1 a 4). A infecção com um serotipo conduz a protecção permanente contra uma reinfeção homóloga e a protecção parcial e temporária contra uma infecção heteróloga, usualmente com uma duração entre 2 a 12 meses. O declínio desta protecção heteróloga associa-se à ocorrência de febre hemorrágica de dengue numa segunda infecção por um serotipo distinto da primeira infecção (Nimmannitya, 2009). Apesar de existirem descrições de epidemias de dengue, conhecidas como febre articular (“*joint fever*” em língua inglesa), desde os finais do século XVIII, foi somente durante a segunda guerra mundial que se progrediu, de forma substancial, para o conhecimento etiológico da doença. A epidemiologia, nomeadamente no Pacífico Sul

foi determinante para impulsionar os esforços de investigação e em 1944, Sabin e os seus colaboradores reconheceram e isolaram o serotipo-1 no Havai e o serotipo-2 na Nova Guiné (Henchal e Putnak, 1990). Mais tarde, em 1957, foram isolados o serotipo-3 e o serotipo-4 nas Filipinas (Gould e Solomon, 2008). A reactividade cruzada com outros *Flavivirus*, incluindo o vírus da febre amarela, o vírus da encefalite japonesa e o vírus do Nilo Ocidental, ficou comprovada em 1950, por Sabin (Henchal e Putnak, 1990).

Relativamente à presença do vírus dengue em África, os primeiros isolamentos do serotipo-1 e do serotipo-2 ocorreram a partir de amostras colhidas durante uma epidemia na Nigéria, no período de 1964 a 1968. O serotipo-3 foi inicialmente documentado durante uma epidemia em Pemba, Moçambique, em 1984-1985 e o serotipo-4 foi detectado no Senegal na década de 1980 (Teles, 2011). Nos últimos anos, a expansão do serotipo-3 na África Ocidental tem sido preocupante e foi responsável por uma epidemia sem precedentes em Cabo Verde, afectando cerca de 17 224 indivíduos em 2009 (Franco et al., 2010).

Em zonas europeias de clima temperado salienta-se a transmissão autóctone do vírus dengue serotipo-1 no Sul da França e na Croácia onde existe *Aedes albopictus* (La Ruche et al., 2010; Gjenero-Margan et al., 2011) e na Ilha da Madeira, onde ocorreu uma epidemia com mais de 2000 casos reportados e onde existia há vários anos a documentação de *Aedes aegypti* (Sousa et al., 2012).

A infecção por vírus dengue é frequentemente assintomática ou apresenta-se como uma doença febril aguda autolimitada. Contudo, sobretudo em adultos ou em adolescentes, tanto pode ser uma doença benigna, como uma doença incapacitante denominada de febre de dengue clássica, que se manifesta após um período de incubação, que em média dura 5 a 8 dias. A febre costuma iniciar-se de forma abrupta e faz-se acompanhar de cefaleias, arrepios, dor retro-orbitária, particularmente associada aos movimentos ou à pressão ocular, fotofobia, mialgias e artralgias generalizadas. Tem sido descritos múltiplos tipos de exantema; inicialmente pode ser transitório, manifestando-se como uma erupção ruborizada na face, pescoço e tronco; outras vezes pode ser conspícuo, aparecendo ao terceiro ou ao quarto dia de doença, iniciando-se no tronco e estendendo-se à face e às extremidades, com características escarlatiniformes

ou maculopapular, podendo ser ocasionalmente pruriginoso e acompanhado de hiperestesia dérmica. Também pode aparecer uma linfadenopatia generalizada, bem como petéquias, sobretudo a nível das extremidades e um teste de torniquete positivo. Na fase final do período febril ou imediatamente após a defervescência, o exantema pode esvanecer-se e as petéquias poder-se-ão agrupar sobretudo nas extremidades, originando um exantema petequial confluyente com zonas de pele íntegra. Complicações hemorrágicas como epistáxis, gengivorragias, hemorragias gastrointestinais, hematúria e hipermenorreia têm sido reportadas em muitas epidemias. Uma pequena proporção (1% a 3%) dos doentes desenvolvem formas graves da doença como a febre hemorrágica e o síndrome de choque do dengue, que se associam a taxas de mortalidade na ordem de <1% até 5%. Laboratorialmente, a particularidade mais relevante é a leucopenia, habitualmente perceptível 2 a 3 dias após o início da sintomatologia e com duração durante o período febril. Também pode surgir trombocitopenia moderada a grave.

A primeira epidemia de febre hemorrágica de dengue ocorreu nas Filipinas no período de 1953-1954. Todos os serotipos são potenciais agentes etiológicos, embora o serotipo-2 tenha sido o mais implicado. Destaca-se ainda por atingir preponderantemente crianças com idade inferior a 16 anos e por se associar a uma infecção secundária por um serotipo heterólogo. As pérolas patofisiológicas são o extravasamento capilar com fuga de líquidos para o espaço extravascular e anormalidades na hemostase, que poderão conduzir ao choque hipovolémico e à morte. Clinicamente, caracteriza-se pela presença de febre contínua durante 2 a 7 dias, diátese hemorrágica, hepatomegália e choque, conjuntamente com as seguintes alterações laboratoriais: trombocitopenia (inferior ou igual a $100\,000/\text{mm}^3$) e hemoconcentração (elevação superior ou igual a 20% do valor do hematócrito).

Em 2009, a Organização Mundial de Saúde, reviu as definições de febre hemorrágica de dengue, que incluía um estágio de síndrome de choque, uma vez que muitos casos graves não preenchiam os critérios previamente definidos, condicionando dificuldades de categorização dessas entidades. Deste modo, o novo modelo distingue dengue do dengue grave e propõe sinais de alarme para a progressão da doença, tais como: dor e irritação abdominal, vômitos persistentes, acumulação de líquidos (p. ex. ascite e derrame pleural), sangramento das mucosas, letargia, hepatomegália superior a 2 cm,

um aumento do hematócrito concomitantemente com uma descida rápida da contagem plaquetar. Os critérios de dengue grave são a evidência de extravasamento capilar, hemorragias clinicamente relevantes e o envolvimento de um órgão-alvo como o fígado (aminotransferases >1000 U/L), sistema nervoso central (alterações do estado de consciência), coração (p. ex. miocardite e pericardite), entre outros.

O diagnóstico laboratorial é estabelecido directamente pela detecção de componentes virais séricos, ou indirectamente por métodos serológicos. No período febril inicial, a detecção de ácido nucleico no soro por reacção da transcriptase reversa seguida de reacção em cadeia da polimerase, vulgarmente conhecida por RT-PCR, um acrónimo em língua inglesa, ou a detecção antigénica da proteína não estrutural NS1 por ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA - acrónimo em língua inglesa) são suficientes para confirmar o diagnóstico. A cultura e o isolamento viral são realizados somente em laboratórios de referência mundial, pelo que não estão comumente disponíveis. O diagnóstico serológico comporta a detecção, por técnicas de ELISA e/ou ensaios imunocromatográficos, de anticorpos das classes IgM e IgG, acautelando-se a possibilidade de reactividade cruzada com outros vírus do género *Flavivirus*. Recorde-se que a detecção de IgM ocorre a partir do 4º ou 5º dia do início da sintomatologia. A seroconversão da IgM ou da IgG em duas amostras colhidas, uma na fase aguda e outra na fase de convalescença (após 15 dias), bem como um aumento de pelo menos 4 vezes na titulação dos anticorpos IgG, também permite confirmar o diagnóstico (*World Health Organization*, 2009). A utilização de TDR já foi objecto de exposição num dos subcapítulos anteriores.

O tratamento é sintomático e de suporte, privilegiando-se a hidratação e a utilização de antipiréticos como o paracetamol ou o metamizol. Os salicilatos não devem ser administrados pelo risco acrescido de hemorragias, assim como os anti-inflamatórios não esteroides e outros fármacos com potencial hemorrágico, que podem aumentar o risco de evolução para formas graves da doença. A sobrecarga hídrica constitui uma preocupação no manuseamento dos casos graves, pelo que a sua abordagem deverá ser feita sob vigilância clínica apertada. A transfusão sanguínea pode ser um procedimento adjutório de emergência nos casos graves. Até ao momento, não existem antivíricos específicos disponíveis.

Desde 2015 que está disponível, em alguns países, uma vacina contra o vírus dengue e que a sua utilização está licenciada somente para populações de países endémicos.

1.4.2. Chikungunya: caracterização geral

O vírus chikungunya foi isolado na Tanzânia, no seguimento de uma epidemia que atingiu, em 1952 e 1953, o planalto de Newala (Tanzânia) e Mocímboa da Praia (Moçambique), regiões de influência maconde (grupo étnico bantu) e separadas pelo rio Rovuma, que constitui a fronteira natural entre os dois países (Robinson, 1955; Ross, 1956). Etimologicamente, chikungunya significa “caminhar dobrado” e é um termo de um dialecto maconde da Tanzânia que expressa uma característica clínica relevante, nomeadamente as artralrias incapacitantes. A sua expressão geográfica com atingimento do continente asiático foi reportada, ainda na década de 1950, com o surgimento de epidemias nas Filipinas, na década de 1960 na Índia e desde a década de 1980, na Indonésia (Pialoux et al., 2007). Relativamente a outras regiões do continente africano, houve documentação de ocorrência em múltiplos países da África Ocidental, Central e Austral (Pialoux et al., 2007). Em Angola, foi isolado na década de 1970, tendo sido denominado de “*Kâtolu Tôlu*”, termo em língua quimbundo que significa “quebra-ossos” (Filipe e Pinto, 1973). Na República Democrática do Congo, onde se registaram epidemias nos anos 1999 e 2000, é conhecido pela expressão “*buka-buka*”, que significa “quebrado, quebrado” (Muyembe-Tamfum et al., 2003).

É um *Alphavirus*, membro do complexo de vírus da Floresta de Semliki e está intimamente relacionado com o vírus o'nyong-nyong, que é provavelmente endémico na África Oriental e com o vírus Mayaro, que tem sido reconhecido nas Caraíbas, América Central e do Sul, especialmente na bacia Amazónica (Powers et al., 2001). Trata-se de um vírus de ácido ribonucleico de polaridade positiva, composto por proteínas não estruturais e proteínas estruturais, das quais se destacam a proteína da nucleocápside e as glicoproteínas E1 e E2 parcialmente incorporadas no invólucro lipídico (Simizu et al., 1984). Foram descritas quatro linhagens, nomeadamente uma da África Ocidental, outra da África Central, Oriental e Sul, uma da Ásia e outra do Oceano Índico. Esta última linhagem que é responsável pelas epidemias com maior expressão, evoluiu a partir do genótipo enzoótico da África Central, Oriental e Sul e

emergiu primariamente na orla costeira do Quênia em 2004, propagando-se rapidamente ao Oceano Índico, Índia e Sudeste Asiático. De facto, foi uma alteração na sequência genética que alterou a glicoproteína E1 do invólucro viral, criando uma variante denominada de E1-A226V (substituição do aminoácido alanina por valina na posição 226) que permitiu a adaptação a uma espécie de mosquito, não infectada previamente pelo vírus chikungunya, o *Aedes albopictus*, aumentando assim a sua infecciosidade e transmissibilidade (Tsetsarkin et al., 2011). Esta estirpe foi presumivelmente transportada para a Itália, em 2007, por um viajante virémico proveniente da Índia, tendo sido responsável pela existência de uma epidemia numa região de clima temperado com presença de *Aedes albopictus* (Rezza et al., 2007). Este mosquito com vasta distribuição geográfica, teve a sua origem na Ásia num ciclo silvático mas mostrou uma capacidade admirável de adaptação aos seres humanos e aos fenómenos de urbanização, suplantando o *Aedes aegypti* em muitos países, transformando-se assim num vector importante para muitos arbovírus. Pode sobreviver tanto em ambientes rurais como urbanos, tanto é zoofílico como antropofílico, tem um ciclo de vida relativamente longo (4 a 8 semanas) e os seus ovos são altamente resistentes, permanecendo viáveis durante a estação seca. Habitualmente é agressivo e silencioso, possui actividade diurna e um voo radial de 400 a 600 metros. Foi introduzido, provavelmente a partir do comércio de pneus usados e de plantas ornamentais, em regiões de clima temperado como a Europa, onde a sua presença está documentada em França, Espanha, Bélgica, Holanda, Croácia, Bósnia, Grécia, entre outros países (Pialoux et al., 2007).

A manutenção do vírus chikungunya na natureza é efectuada por dois ciclos de transmissão, um silvático, zoonótico, genericamente restrito ao continente africano e que envolve, principalmente, primatas não humanos, pequenos mamíferos e mosquitos silváticos *Aedes* spp. (p. ex. *Aedes furcifer* e *Aedes africanus*) e outro urbano, em que o Homem constitui o reservatório primário e o *Aedes aegypti*, o vector convencional da maioria das epidemias, que tradicionalmente ocorriam no continente asiático em populações com fraca imunidade (Tsetsarkin et al., 2011). Relembre-se que os criadouros deste mosquito ocorrem em reservatórios de água fresca em ambientes urbanos e suburbanos. Em regiões onde prevalece o ciclo silvático, endémico, existe transmissão contínua entre populações com elevada imunidade ou transmissão por

pequenos surtos quando aumenta a densidade de mosquitos em regiões com populações não imunes. Outra forma de transmissão, que ficou documentada durante a epidemia no Oceano Índico, na ilha da Reunião, foi a transmissão materno-fetal, tendo existido casos neonatais de meningoencefalite e coagulação intravascular disseminada, bem como de morte fetal (Robillard et al., 2006).

Os relatos clínicos da epidemia de chikungunya no Planalto Maconde, em 1952-1953 atestam que se trata de uma doença clinicamente indistinguível da febre de dengue mas com intensas dores articulares, que geralmente se iniciam subitamente (minutos a horas) sem qualquer sintomatologia prodrômica e que são intensificadas pelos movimentos, atingem sobretudo as grandes articulações, impedem o sono e são altamente limitativas e incapacitantes, podendo permanecer em alguns doentes até 4 meses (Robinson, 1955).

O período de incubação é de 3 a 12 dias, com uma média de 2 a 7 dias. Para além do início súbito das artralguas intensas, salienta-se que pode haver um predomínio de dor lombar, associada a mialgias, febre elevada, linfadenopatia generalizada e conjuntivite. Habitualmente existe uma melhoria clínica ao fim de 2 a 3 dias, seguido de aparecimento de um exantema generalizado maculopapular em cerca de metade dos doentes (Smith et al., 2009). As manifestações hemorrágicas são extremamente raras, podendo ocorrer petéquias e gengivorragia, sobretudo em crianças. Num estudo realizado em doentes com febre hemorrágica na Tailândia, nos anos de 1962 a 1964, constatou-se que 83% dos casos foram atribuídos ao vírus dengue e 7,6% ao vírus chikungunya (Nimmannitya et al., 1969). A frequência de positividade do teste de torniquete, de petéquias e de epistaxis foi semelhante nas duas infecções. Contudo, quadros de choque e hemorragias gastrointestinais só ocorreram em doentes com dengue.

Durante a epidemia de chikungunya que assolou a ilha da Reunião no Oceano Índico em 2005 e 2006, com cerca de 266000 pessoas atingidas, verificaram-se formas clínicas atípicas em aproximadamente 0,3% da totalidade dos casos, representando 36% dos casos de maior gravidade (Dupuis-Maguiraga et al., 2012). Deste modo, ocorreram quadros de meningoencefalite, síndrome de Guillain-Barré, insuficiência renal, insuficiência respiratória, miocardite/pericardite, hepatite, hiperpigmentação, dermatose bolhosa e púrpura, entre outras manifestações atípicas. Os casos de maior gravidade,

por vezes fatais, aconteceram sobretudo em idosos e crianças e/ou indivíduos com doenças crónicas subjacentes (Burt et al., 2012). Contudo, a taxa de mortalidade em epidemias tem sido baixa (1 em 1000 casos).

A artrite crónica após uma infecção por vírus chikungunya está bem evidenciada e pode comportar-se clinicamente como a artrite reumatóide. Em fase aguda, a artrite pode ser naturalmente simétrica mas nas formas crónicas pode ser assimétrica e até uma monoartrite (Manimunda et al., 2010). Em alguns casos, a rigidez, o edema e a dor articular podem persistir mais de 3 anos, sendo que os indivíduos acima dos 45 anos são os mais susceptíveis à persistência das queixas articulares (Burt et al., 2012).

O diagnóstico laboratorial assenta em métodos serológicos (detecção de anticorpos das classes IgM e IgG) e em métodos de biologia molecular (RT-PCR). O isolamento viral pode ser obtido por culturas celulares em centros altamente especializados. Na fase de virémia (nos primeiros sete dias de infecção), a RT-PCR tem bastante utilidade. A IgM é detectável, em média, a partir do segundo dia e persiste durante várias semanas e até 3 meses, enquanto a IgG surge na fase de convalescença e pode persistir durante anos (Pialoux et al., 2007). Também existem ensaios de imunoabsorção enzimática de captura antigénica no soro e líquido cefalorraquidiano (Burt et al., 2012). Serologicamente, existe a possibilidade de reactividade cruzada com os restantes vírus membros do complexo antigénico da Floresta de Semliki (p. ex.: vírus da Floresta de Semliki em África e Eurásia, vírus Middelburg em África, vírus o'nyong-nyong em África, vírus do Rio Ross na Austrália e Oceania, vírus da Floresta de Barmah na Austrália, vírus Getah na Austrália e Ásia, vírus Sagiyama no Japão, vírus Bebaru na Malásia, vírus Mayaro na América do Sul e vírus Una, também na América do Sul) e em menor frequência com a IgM do que com a IgG (Smith et al., 2009).

O tratamento é meramente sintomático, não existindo, até à data, agentes antivíricos com eficácia específica. A utilização de anti-inflamatórios não esteroides, nomeadamente para controlo das queixas álgicas articulares só deverá ser efectuada após exclusão de infecção por vírus dengue.

1.4.3. Co-infecções de vários arbovírus com ou sem co-infecção com *Plasmodium* spp.

A circulação concomitante de vários arbovírus, apesar de rara, foi identificada em algumas epidemias, como foi o caso da epidemia de febre amarela em Luanda, em 1971, durante a qual também se isolou o vírus chikungunya, facto já eludido previamente.

A competência de alguns vectores para múltiplos arbovírus é paradigmática no caso do *Aedes albopictus*, uma vez que o mesmo pode veicular, pelo menos, 22 arbovírus (Gratz, 2004).

Também é compreensível que existam relatos de co-infecção de dengue com outros arbovírus, nomeadamente chikungunya, uma vez que a dengue é a arbovirose mais prevalente a nível global e o chikungunya, um dos arbovírus com maior disseminação geográfica nos últimos tempos, adicionando-se a similitude da clínica em ambas infecções. No entanto, a primeira documentação de circulação concomitante destes dois arbovírus, ocorreu na Tailândia, em 1962, em quatro doentes hospitalizados com o diagnóstico de febre hemorrágica (Nimmannitya et al., 1969).

Após a emergência da estirpe do Oceano Índico do vírus chikungunya, em 2004, na faixa costeira do Quénia, surgiram, em 2006, 10 casos de co-infecção com dengue em Madagáscar, num total de 55 amostras séricas analisadas (Ratsitorahina et al., 2008) e 68 casos em 550 amostras investigadas na Índia no ano de 2010 (Taraphdar et al., 2012).

Destaca-se ainda a ocorrência de epidemias simultâneas do serotipo-2 do dengue e de chikungunya nos Camarões, em 2006 e no Gabão, em 2007. Neste último país, no período compreendido entre 2007 e 2010, evidenciaram-se 37 casos de co-infecção, de um total de 4287 casos investigados e durante a epidemia ocorrida no ano de 2010, registaram-se 38 casos de co-infecção, de um total de 2826 amostras analisadas (Caron et al., 2012).

Efectivamente, existem múltiplas descrições de co-infecções do vírus dengue com outros agentes patogénicos, incluindo com *Salmonella typhi*, na Indonésia (Sudjana e Jusuf, 1998); com *Shigella sonnei* adquirida na Índia (Charrel et al., 2003); com bacteriémia por *Klebsiella pneumoniae*, por *Roseomonas* spp., *Moraxella lacunata*,

Klebsiella ozaenae e *Enterococcus faecalis*, em doentes com febre hemorrágica de dengue, em Taiwan (Lee et al., 2005); bacteriémia por *Staphylococcus aureus* meticilina sensível, em Singapura (Chai et al., 2007); com o vírus Influenza H1N1, em Porto Rico (Lopez Rodriguez et al., 2010); com o vírus da hepatite A, na Índia (Zaki e Lad, 2011), com *Burkholderia pseudomallei*, no Brasil (Macedo et al., 2012), com *Leptospira* spp. no México (Dircio Montes Sergio et. al, 2012) e com *Plasmodium* spp., entre outros agentes.

Por razões óbvias inerentes ao impacto clínico acrescido de maior morbidade, bem como por interesse epidemiológico, a co-infecção dengue e malária assume uma relevância especial. O primeiro caso foi descrito em França numa viajante, após o regresso de uma estadia de 18 dias em países da África Ocidental, nomeadamente Guiné, Senegal e Serra Leoa (Charrel et al., 2005). Posteriormente, registaram-se casos em Timor-Leste (Ward, 2006), Índia (Hati et al., 2012) e Guiana Francesa (Epelboin et al., 2012).

As co-infecções triplas, com dengue, chikungunya e malária, bem como a co-infecção por chikungunya e malária não tinham sido descritas até à data de início deste trabalho de investigação.

1.5. Fundamentação e Objectivos do trabalho de investigação

A Cimeira do Milénio, que teve lugar em Nova Iorque, nos dias 6 a 8 de Setembro de 2000, constituiu um marco histórico para responder às necessidades especiais de África, onde se inclui o combate à malária. Foram oito os objectivos do desenvolvimento do milénio, sendo o sexto o combate ao VIH/SIDA, malária e outras doenças.

No ano de 2010 foi publicado um relatório oficial, em nome das Nações Unidas, onde se atestou que os países africanos que detinham uma cobertura elevada, em termos de mosquiteiros e de programas de tratamento, registaram uma diminuição do número de casos de malária, que em nove países foi superior a 50% (Nações Unidas, 2010). Posteriormente, no relatório de 2015, foi indicado uma diminuição da taxa de incidência mundial da malária em 37% e uma diminuição de 58% da taxa global da mortalidade atribuída à malária, tendo sido reforçadas as intervenções de prevenção e de tratamento da malária, com destaque para as redes mosquiteiras duradouras tratadas com

insecticida, pulverização residual de interiores, testes de diagnóstico e terapias combinadas à base de artemisinina (Nações Unidas, 2015). A aplicação dos TDR assumiu um papel essencial para a consecução dos objectivos relativamente ao controlo da malária.

No apanágio de uma visão comum para a Humanidade e de um contrato social entre os líderes mundiais e os povos, foram apresentados, em 2015, os dezassete objectivos do desenvolvimento sustentável. O terceiro objectivo, “garantir o acesso à saúde de qualidade e promover o bem-estar para todos, em todas as idades”, englobou o fim da epidemia da malária até 2030 (Nações Unidas, 2016). Tendo este propósito em mente, todas as estratégias para mitigar a carga e o impacto da malária são significativas, pelo que o aperfeiçoamento da capacidade diagnóstica, bem como do seu diagnóstico diferencial, não deverão ser descurados.

A concepção de uma abordagem do doente febril em zona endémica de malária, é de facto, assaz relevante. Não existem muitos estudos nesta área, no que concerne as arboviroses nos países africanos, incluindo Angola. Como demonstrado nos subcapítulos anteriores, os estudos sobre arboviroses em Angola datam da época colonial, daí que seja essencial actualizar este conhecimento.

Na eventualidade de existirem casos de arboviroses não diagnosticados, certamente que na sua maioria, serão tratados como malária, uma vez que a apresentação clínica pode ser similar. O diagnóstico presumptivo de “malária clínica” ainda é uma prática comum em Angola, quer na ausência de testes laboratoriais confirmatórios de malária, quer na presença dos mesmos com um resultado negativo.

A urbanização das regiões africanas de clima tropical e subtropical conduz à existência de terrenos favoráveis para a propagação de epidemias como dengue e chikungunya, que é propiciada pela elevada densidade populacional. Cidades como Lagos (Nigéria), Kinshasa (República Democrática do Congo), Abidjan (Costa de Marfim), Nairobi (Quénia), Dar es Salaam (Tanzânia), Dacar (Senegal) e Luanda (Angola) são exemplos de verdadeiras megacidades em zonas de clima tropical, por vezes com localização próxima a zonas de actividade enzoótica para alguns arbovírus e com populações humanas não imunes. Outros factores, de que são exemplo a inexistência ou interrupção de programas de imunização, os movimentos populacionais migratórios voluntários ou

forçados, as condições deficitárias de saneamento básico e das condições habitacionais, o crescimento das populações de animais domésticos e sinantrópicos, também contribuem para a disseminação das arboviroses. Adicionalmente, os fenómenos de urbanização também facilitam a colonização destes habitats por mosquitos altamente antropofílicos, como *Aedes aegypti* (Alirol et al., 2010; Weaver e Reisen, 2010). A presença deste mosquito em Angola ficou comprovada na década de 1970, de acordo com os estudos entomológicos realizados à data (Ribeiro, 1973), bem como em estudos mais recentes realizados no Lobito (Carnevale et al., 2015).

As ligações históricas entre Portugal e Angola justificam o fluxo de viagens entre os dois países, existindo em Angola uma população expatriada de origem portuguesa bastante significativa e que porventura poderá estar em risco para a aquisição de arboviroses. Desde 2008 que Angola se tornou um país atrativo para a emigração portuguesa. Segundo dados do censo português de 2011, 248 569 residentes em Portugal declararam já ter habitado em Angola por um período contínuo de pelo menos um ano. Destes, 83,9% possuíam nacionalidade portuguesa. Nesse mesmo ano, existiam cerca de 100 000 portugueses inscritos nos consulados de Angola (Sousa Galito, 2015).

Aquando do início deste trabalho de investigação, em 2012, a importância médica atribuída às arboviroses em Angola, era certamente residual. Apesar de todo este desconhecimento, não devemos descorar a contribuição da guerra civil que grassou e devastou Angola durante 27 anos (1975-2002) e que também teve como resultado a destruição das infraestruturas sanitárias, a alteração do padrão epidemiológico das doenças infecciosas e a atenuação da implementação de programas de âmbito nacional de vigilância e controlo de doenças endémicas. No entanto, deve ser realçado, que a economia de Angola cresceu bastante nos últimos anos, o que permitirá melhorar e reconstruir as infraestruturas de saúde, bem como adoptar medidas para o controlo das grandes doenças endémicas.

Provavelmente dengue e chikungunya constituem as duas principais arboviroses emergentes e/ou re-emergentes na África Subsaariana (Hertz et al., 2012). Consequentemente será lícito indagar:

Introdução

Qual a importância das arboviroses, designadamente dengue e chikungunya, como causa de febre em doentes com clínica suspeita de malária?

E esta, é de facto a grande questão que motivou a realização deste trabalho.

Nesta linha de pensamento foram definidos os seguintes objectivos:

-Objectivo geral:

- identificar a presença do vírus dengue e do vírus chikungunya em doentes com síndrome febril suspeita de malária em território angolano, de forma a contribuir para a sua correcta valorização no diagnóstico diferencial;

-Objectivos específicos:

- realizar a caracterização clínica e epidemiológica da amostra de pacientes incluídos;
- identificar factores de risco para as infecções por dengue e por chikungunya;
- identificar e caracterizar a presença de co-infecções (dengue/chikungunya, dengue/malária, chikungunya/malária, dengue/chikungunya/malária), de forma a contribuir para a sua correcta valorização no contexto angolano;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tipo de estudo

Face aos objectivos desejados, nomeadamente a identificação de circulação do vírus dengue e do vírus chikungunya como agentes etiológicos de síndrome febril suspeita de malária em território angolano e não existindo dados actualizados nas últimas décadas de seroprevalência destes arbovírus, foi desenhado um estudo observacional, transversal e descritivo.

A opção por este tipo de estudo prende-se com o facto de se pretender descrever características de uma determinada população no que diz respeito a determinadas variáveis e aos seus padrões de distribuição, bem como a associações entre variáveis, num único momento temporal. Salientam-se como principais vantagens a prontidão com que se podem tirar conclusões e uma maior facilidade em termos logísticos.

2.2. Implementação do estudo

A vertente prática da execução do trabalho de campo em Angola foi conduzida no âmbito de um protocolo de pesquisa intitulado “Diagnóstico Diferencial de Síndromes Febris Suspeitos de Malária” da responsabilidade do Departamento Nacional de Controlo de Doenças, da Direcção Nacional de Saúde Pública, do Ministério da Saúde da República de Angola. A decisão da escolha das províncias ficou sob a alçada das entidades supranomeadas e a escolha das unidades sanitárias de atendimento à saúde sob a responsabilidade da Direcção de Saúde Provincial do Governo Provincial das respectivas províncias.

A prestação de serviços de saúde em Angola está dividida em três níveis (primário, secundário e terciário), que correspondem aos três níveis de governo (municipal, provincial e nacional). A atenção primária engloba postos de saúde, centros de saúde e hospitais municipais, a atenção secundária os hospitais gerais e a terciária os hospitais centrais. Este estudo focou-se somente em centros de saúde e hospitais municipais, privilegiando-se deste modo os cuidados de saúde primários, pela sua acessibilidade a todos os cidadãos, constituindo uma porta de entrada do sistema de saúde público.

A primeira fase do estudo, essencialmente exploratória, foi realizada em 2012 e o facto de terem ocorrido epidemias de dengue e chikungunya em Luanda durante os anos de 2013 e 2014 contribuiu para a decisão de replicar o estudo numa segunda fase, que por motivos de dificuldade na organização e prestação do apoio logístico por parte das unidades locais, só aconteceu em 2015.

2.3. Áreas geográficas específicas do estudo

2.3.1. Província do Huambo (Fase 1)

A província do Huambo situa-se na região Centro – Oeste de Angola, ocupa uma área de 35 771 km² (2,6% do território nacional) e tem uma altitude média de 1750 metros, o que traduz a sua posição no planalto central.

A sua delimitação geográfica é feita com as seguintes províncias: Cuanza-Sul (a Norte), Bié (a Leste), Huíla (a Sul) e Benguela (a Oeste).

Segundo os dados do Instituto Nacional de Estatística de 2016, é a quarta província mais populosa, com cerca de 2 019 555 habitantes (8% da população total), seguida das províncias de Benguela (8%), Huíla (10%) e Luanda (27%). A sua população insere-se no complexo sociocultural Ovimbundu.

A cidade do Huambo foi fundada em 1912, dista 600 km da cidade de Luanda e é a capital da província. Esta é constituída por onze municípios, que se encontram ordenados de forma decrescente de acordo com a percentagem demográfica da seguinte forma: Huambo, Bailundo, Caála, Chicala Choloanga, Longuimbali, Longonjo, Mungo, Catchiungo, Ecunha, Ucuma e Chinjenje. Os três primeiros municípios agregam cerca de dois terços da população da província.

Tradicionalmente reconhecida como um dos “celeiros” de Angola, não é de estranhar que a nível provincial o sector económico mais relevante seja o agropecuário e que a maioria (52%) da sua população resida em meio rural. Em oposição, somente 37,4% dos habitantes de Angola residem em meio rural.

O estudo foi desenvolvido nos meses de Fevereiro a Abril do ano de 2012 em sete unidades de saúde dos seguintes municípios:

- Huambo [população estimada: 1 126 225 habitantes (Governo Provincial do Huambo, 2012, comunicação pessoal, 17 Fevereiro)]
 - Centro de Saúde do Casseque, localizado a cerca de 8 km da cidade do Huambo;
 - Centro de Saúde Materno-infantil da Mineira, localizado na parte baixa da cidade do Huambo;
- Bailundo [população estimada: 324 699 habitantes (Governo Provincial do Huambo, 2012, comunicação pessoal, 17 Fevereiro)]
 - Hospital Municipal do Bailundo, situado a 77 km da cidade do Huambo;
 - Hospital da Missão Evangélica do Chilume, localizado na periferia da cidade do Bailundo;
- Caála [população estimada: 260 620 habitantes (Governo Provincial do Huambo, 2012, comunicação pessoal, 17 Fevereiro)]
 - Centro de Saúde da Calenga, situado a 34 km da cidade do Huambo;
 - Hospital Municipal da Caála, localizado a 25 km da cidade do Huambo;
- Londuimbali [população estimada: 161 367 habitantes (Governo Provincial do Huambo, 2012, comunicação pessoal, 17 Fevereiro)]
 - Hospital Municipal do Alto-Hama, localizado a 71 km da cidade do Huambo.

2.3.2. Província de Benguela (Fase 2)

A província de Benguela situa-se na parte setentrional e ocidental de Angola e é circunscrita a Norte pela província do Cuanza-Sul, a Sudeste pela província do Namibe, a Leste pela província do Huambo e a Oeste pelo Oceano Atlântico. Tem uma área territorial de 39 827 km², o que corresponde a 3,2% da superfície total do país. Topograficamente é composta por planaltos escalonados cortados por vales e rios, sendo característicos os vales de rios secos, onde apenas se acumula água durante o período das chuvas.

Constitui a terceira província angolana mais populosa, com cerca de 2 231 385 habitantes (Instituto Nacional de Estatística, 2016), maioritariamente pertencentes ao grupo etnolinguístico Ovimbundu. Contrariamente à província do Huambo, 64% dos habitantes da província de Benguela residem em meios urbano e periurbano.

A cidade de Benguela foi fundada em 1617, dista 692 km de Luanda e é a capital da província. Esta é constituída por dez municípios, que se encontram ordenados de forma decrescente de acordo com a percentagem demográfica da seguinte forma: Lobito, Benguela, Catumbela, Cubal, Ganda, Bocoio, Baía Farta, Balombo, Caimbambo e Chongoroi. Os três primeiros municípios localizados na faixa litoral reúnem cerca de dois terços da população da província.

A segunda fase do estudo foi realizada nos meses de Maio e Junho do ano de 2015 em três unidades de saúde dos seguintes municípios:

- Chongoroi [população estimada: 76 752 habitantes (Governo Provincial de Benguela, 2015, comunicação pessoal, 19 Maio)]
 - Hospital Municipal do Chongoroi, localizado a 150 km da cidade de Benguela, no interior da província;
 - Centro de Saúde do Senje, situado a 18 km do Chongoroi;
- Catumbela [população estimada: 350 000 habitantes (Governo Provincial de Benguela, 2015, comunicação pessoal, 19 Maio)]
 - Hospital Municipal da Catumbela, localizado a 20 km da cidade de Benguela.

2.4. Processo de amostragem

Identificou-se como *população-alvo*, os doentes com síndrome febril suspeita de malária que recorram a unidades públicas de prestação de cuidados de saúde em território angolano. O facto de não existir estudos piloto sobre a prevalência de arbovírus em Angola, nem inquéritos relativamente actualizados, nem amostras preliminares, nem conhecimento da estrutura da população relativamente ao objectivo do estudo impossibilitou a utilização de um método de amostragem aleatória e o cálculo da *dimensão da amostra* por métodos matemáticos.

Para avaliar esta população, utilizou-se um *método de selecção da amostra* não aleatório por critério de conveniência, assumindo-se antecipadamente o viés de selecção de participantes.

O processo de recrutamento fundamentou-se no julgamento humano, tendo sido definidos os seguintes critérios:

-critérios de inclusão:

- Presença de temperatura axilar superior ou igual a 37,5°C à admissão hospitalar e/ou à data de recrutamento no estudo; **e/ou**
- História de temperatura axilar superior ou igual a 37,5°C e/ou referência a febre não quantificada (“calafrios”, “arrepios”, “tremores”, “corpo quente”, “queimação do corpo”) mantida e/ou frequente; **e**
- Clínica suspeita de malária baseada na presença de pelo menos um dos seguintes sinais e/ou sintomas: febre, cefaleias, mialgias, desconforto abdominal, letargia, anorexia e paroxismo malárico (calor, calafrio, suor);
- Obtenção de consentimento informado livre e esclarecido;

-critérios de exclusão:

- Recém-nascidos (idade inferior ou igual a 28 dias);
- Doentes com idade inferior a 18 anos, quando não acompanhados de representantes legais e/ou de acompanhantes com idade superior a 18 anos;
- Escala de coma de Glasgow inferior a 11;
- Presença de febre em relação com foco infeccioso já conhecido;
- Doentes febris do foro não médico (cirúrgico, ortopédico, entre outros);

A gravidez não foi considerada um critério de exclusão.

2.5. Instrumentos de colheita de dados

Todos os doentes que preenchiam os critérios de inclusão e que aceitaram participar no estudo foram submetidos a um inquérito clínico e epidemiológico, a um exame físico, bem como a colheitas de amostras sanguíneas. Quando disponível no processo clínico dos doentes foi recolhido o último valor analítico da hemoglobina com o intuito de diagnosticar anemia.

2.5.1. Inquérito clínico e epidemiológico

O inquérito clínico e epidemiológico consistiu num formulário em suporte papel preenchido após a obtenção do consentimento informado. Foi utilizada a técnica da entrevista semi-estruturada (focalizada) que permitiu a recolha de informação através da comunicação verbal. Sempre que necessário, foi solicitado o apoio a um profissional de saúde da instituição de saúde local para auxiliar na tradução e interpretação da língua umbundo para os pacientes que não se expressavam em português.

O formulário aplicado englobou dados demográficos e socioeconómicos com referência a condições habitacionais, dados clínicos de anamnese e exame objectivo e dados laboratoriais. As variáveis recolhidas encontram-se esquematizadas no quadro seguinte:

Dados demográficos e socioeconómicos
1) Data de entrada no estudo; 2) unidade sanitária; 3) município de residência; 4) sexo; 5) gravidez; 6) idade; 7) escolaridade; 8) profissão; 9) tipo de habitação; 10) número de divisões da habitação; 11) número de elementos do agregado familiar; 12) casa de banho e/ou latrina; 13) canalização de água; 14) origem da água utilizada nos domicílio; 15) rede de esgoto no domicílio; 16) energia eléctrica no domicílio; 17) posse e número de redes mosquiteiras; 18) utilização da rede mosquiteira na última noite; 19) utilização de repelentes e/ou insecticidas domiciliare; 20) contacto directo com animais domésticos; 21) actividades de lavoura; 22) actividades recreativas em rios; 23) viagens nas últimas 3 semanas.

Dados clínicos
a) Imunização contra a febre amarela e data da última administração; b) transfusão sanguínea nos últimos 3 meses; c) utilização de antibióticos e/ou antiparasitários no dia de entrada do estudo; d) diagnóstico de malária nos últimos 3 meses; e) febre nos últimos 3 meses; f) temperatura corporal à admissão no estudo; g) duração da febre; h) tensão arterial à admissão no estudo; i) sintomatologia (febre, mialgias, artralrias, cefaleias, dores retro-oculares, desconforto/dores abdominais, astenia, anorexia, alteração do gosto, náuseas, vômitos, diarreia (com ou sem muco e/ou sangue), corrimento nasal, dispneia, tosse, alterações visuais, lesões cutâneas, prurido, obnubilação, convulsões, hemorragias e/ou outra); j) exame objectivo (palidez cutânea-mucosa, icterícia, sufusão conjuntival, exantema, coma, sinais meníngeos, auscultação cardíaca, auscultação pulmonar, hepatomegália, esplenomegália, adenomegalias, edemas, choque, pulsos arteriais periféricos e/ou outros).
Dados laboratoriais
1) Hemoglobina; 2) TDR (malária, chikungunya e dengue); 3) pesquisa de <i>Plasmodium</i> spp. por microscopia óptica; 4) PCR para <i>Plasmodium</i> spp.; 5) RT-PCR para chikungunya e para dengue.
Destino após a avaliação
a) Internamento; b) domicílio; c) óbito; d) diagnóstico à data de alta pela equipa técnica local.

Quadro 1: Variáveis recolhidas pelo inquérito clínico e epidemiológico.

2.5.2. Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada exclusivamente pelo investigador e para além da colheita da história clínica actual e pregressa e da revisão de órgãos e sistemas, consistiu na realização de um exame físico a todos os doentes incluídos no estudo.

A temperatura corporal axilar foi quantificada no momento de entrada no estudo, assim como foi avaliada a tensão arterial e/ou a palpação dos pulsos arteriais periféricos.

Relativamente ao exame físico as técnicas utilizadas foram: a inspecção estática e dinâmica, a palpação superficial e profunda, a percussão e a auscultação.

2.6. Recolha, armazenamento e processamento laboratorial de amostras biológicas

Para a recolha das amostras biológicas foi realizada uma colheita de sangue venoso capilar por punção digital (picada no dedo com lanceta) para papel de filtro em casos seleccionados, bem como por punção venosa de acessos periféricos (p. ex.: veia cefálica, mediana, basilica, jugular) de cerca de 2 ml de sangue para tubo seco em todos os doentes incluídos. Estas últimas amostras foram centrifugadas a 1500 rotações por minuto durante cinco minutos para separação do soro e descarte do coágulo. Posteriormente, acondicionaram-se as amostras seleccionadas em tubos de microcentrífuga que foram conservados a temperatura de -20°C.

O papel de filtro utilizado foi o *Whatman® 903® Protein Saver Card* ou o *Whatman® FTA® Classic Card* e o seu armazenamento foi feito em sacos de plástico hermeticamente fechados após secagem da amostra a temperatura ambiente. Estes cartões contêm produtos químicos que lisam células, desnaturam proteínas e protegem os ácidos nucleicos da nuclease, da oxidação e dos danos provocados pelos raios ultravioleta. Os ácidos nucleicos das amostras assim preservadas podem manter-se estáveis durante anos.

Sempre que estivessem garantidas as condições técnicas e a disponibilidade dos técnicos dos laboratórios das unidades sanitárias foi realizada uma punção digital para colheita de sangue capilar de modo a executar-se um esfregaço de sangue em camada delgada ou em gota espessa corada pela técnica de Giemsa, permitindo deste modo a detecção de *Plasmodium* spp. por microscopia óptica.

Foram aplicados localmente a todos os participantes os seguintes testes de diagnóstico rápido (TDR):

- *SD BIOLINE® Malaria Antigen P.f/P.v*

Teste rápido de passo único em sangue total humano com cassete que contém uma membrana pré-revestida com anticorpos monoclonais em forma de duas linhas de teste:

anticorpos monoclonais específicos para HRP2 (linha P.f) de *Plasmodium falciparum* e outros anticorpos monoclonais (linha P.v) específicos a lactato desidrogenase de *Plasmodium vivax*. Existe ainda uma linha de controlo.

Relativamente às características de desempenho deste kit, a sensibilidade para *Plasmodium falciparum* é de 99,7%, a sensibilidade para *Plasmodium vivax* é de 95,5% e a especificidade é de 99,5% (Standard Diagnostics, 2011).

O procedimento técnico consiste na colocação de 5 microlitros de sangue capilar no orifício circular destinado à amostra (poço da amostra), seguido da administração de 4 gotas de diluente no orifício quadrado (poço do diluente). A leitura deve ser realizada entre um período mínimo de 15 minutos e um período máximo de 30 minutos.

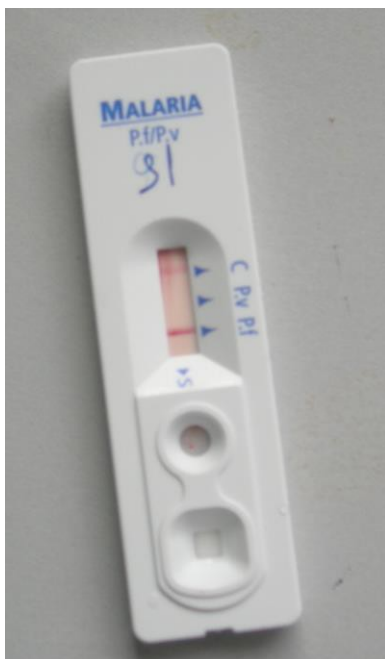


Figura 2: TDR para malária (Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Fevereiro 2012).

- SD BIOLINE® Dengue Duo, Dengue NS1 + Ab Combo

Trata-se de um ensaio imunocromatográfico *in vitro* em uma etapa, projectado para detectar o Ag NS1 do vírus dengue e diferenciar anticorpos IgG/IgM contra o vírus dengue em soro humano, plasma ou sangue total.

Este kit detecta o antígeno NS1 com uma sensibilidade de 92,4% e uma especificidade de 98,4% e os anticorpos IgG/IgM com uma sensibilidade de 94,2% e uma especificidade de 96,4% (Standard Diagnostics, 2010).

Contém dois dispositivos de teste; no lado esquerdo o Ag NS1 com uma linha de teste e uma linha de controlo e no lado direito os anticorpos IgG/IgM com uma linha “G” (IgG), outra “M” (IgM) e uma “C” (controlo).

O procedimento de execução consta dos seguintes passos:

1. Utilizando o conta-gotas descartável, adicionar 3 gotas (cerca de 100 microlitros) da amostra de soro, plasma ou sangue total no poço de amostras no lado esquerdo (Ag NS1);
2. Com uma pipeta capilar de 10 microlitros, adicionar 10 microlitros de amostra de soro, plasma ou sangue total no poço da amostra assinalado com “S” no lado direito da cassette (IgG/IgM);
3. Adicionar 4 gotas (cerca de 90 a 120 microlitros) de diluente da amostra no poço do diluente no lado direito da cassette (IgG/IgM).

A linha de controlo mostra que o diluente foi aplicado com êxito e que os ingredientes activos dos componentes principais da tira ainda estão funcionais. A leitura do teste deve ser feita ao fim de 15 a 20 minutos.



Figura 3: TDR para dengue (Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Fevereiro 2012).

- *SD BIOLINE® Chikungunya IgM*

Trata-se de um ensaio imunocromatográfico de fase sólida para a detecção rápida de anticorpos IgM contra o vírus chikungunya em soro humano, plasma ou sangue total.

A sensibilidade é de 97,1% e a especificidade de 98,9% (Standard Diagnostics, 2008).

O procedimento técnico consiste na aplicação de 1 gota (50 microlitros) de soro ou plasma ou de 2 gotas (100 microlitros) de sangue total no poço da amostra “S”, adicionando-se posteriormente 1 gota de diluente no poço da amostra “S”. Possui uma linha de teste e uma linha de controlo na superfície da cassette. A leitura do teste deve ser feita ao fim de 10 minutos.



Figura 4: TDR para chikungunya (Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Fevereiro 2012).

Durante a primeira fase deste estudo, na presença de um resultado positivo no TDR da malária (P.f e/ou P.v) e/ou de uma pesquisa positiva para *Plasmodium* spp. por microscopia óptica foi colhida uma amostra de sangue capilar por punção digital para papel de filtro com o intuito de se proceder ao diagnóstico molecular da malária por um método de amplificação de ácido desoxirribonucleico (ADN) por reacção em cadeia da polimerase (em língua inglesa *Polymerase Chain Reaction* – PCR) no laboratório de análises clínicas da Unidade de Ensino e Investigação da Clínica Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, avaliando-se assim o desempenho do TDR utilizado. Na segunda fase não se realizou este procedimento por ter sido considerado redundante.

Em ambas as fases deste estudo foi colhida uma amostra de sangue venoso (cerca de 2 ml) por punção venosa periférica para a realização dos TDR. Em todos os casos de positividade dos TDR para dengue (NS1 e/ou IgM e/ou IgG) e para chikungunya (IgM), as amostras séricas foram armazenadas com o intuito de se proceder a um diagnóstico molecular. Deste modo, as amostras foram posteriormente processadas para diagnóstico molecular de ambas as patologias no laboratório de virologia da Unidade de Ensino e

Investigação da Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa por RT-PCR, utilizando-se como molde ácido ribonucleico (ARN) de cadeia simples.

Durante o transporte das amostras biológicas, devidamente acondicionadas e acautelando-se a documentação necessária, quer em Angola, quer na viagem para Portugal, procurou-se manter a cadeia de frio com a utilização de gelo seco em malas térmicas.

Os estudos laboratoriais de biologia molecular que foram realizadas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa foram os seguintes:

- Estudo molecular para malária (PCR para *Plasmodium* spp.)

A extração de ADN genómico a partir de sangue colhido em papel de filtro foi realizada com recurso ao kit *QIAamp DNA Mini Kit*® (Qiagen – EUA). Seguidamente, procedeu-se à amplificação do gene que codifica a subunidade menor do ARN ribossomal do *Plasmodium* spp. pela técnica de reacção em cadeia da polimerase aninhada (*nested-PCR* em língua inglesa). As condições de amplificação estão mencionadas na tabela 1. As sequências nucleotídicas iniciadoras (*primers* em língua inglesa) utilizadas na *nested-PCR* para o género e para as quatro espécies principais de *Plasmodium* spp. foram aquelas descritas na literatura (Snounou et al., 1993; Dinko et al., 2013). Os produtos amplificados foram analisados através de electroforese em gel de agarose (2%) e visualizados sob luz ultravioleta.

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5'	1
Hibridação dos <i>primers</i>	58°C	2'	30 (35 – 2ª reacção)
Extensão	72°C	2'	
Desnaturação	95°C	1'	
Hibridação final	58°C	2'	1
Extensão final	72°C	5'	1

Tabela 1: Condições de amplificação (Snounou et al., 1993).

- Estudo molecular para Dengue e para Chikungunya

A detecção de genomas virais foi levada a cabo por RT-PCR de acordo com o que foi previamente descrito na literatura (Harris et al., 1988; Lanciotti et al., 1992), incluindo a detecção dos 4 principais serotipos do vírus dengue e a utilização de *primers* que têm como alvo a sequência de encapsidação do vírus chikungunya (Pimenta, 2013).

Os produtos de amplificação obtidos compatíveis com a presença de vírus chikungunya foram confirmados, quer mediante a utilização de um protocolo adicional de *nested* RT-PCR usando *primers* específicos para a região UTR-3' do genoma deste vírus (Parreira R, 2017, email, 19 Abril, ricardo@ihmt.unl.pt), quer por sequenciação do produto de amplificação obtido.

A análise da sequência obtida foi utilizada para pesquisar sequências homólogas em bases de dados de acesso público (*GenBank/EMBL/DDBJ*) usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, opção *MegaBlast*).

2.7. Análise estatística dos dados

Foi construída uma base de dados no programa *Microsoft Office Excel®* para registar e organizar os dados obtidos a partir do formulário clínico e epidemiológico, da avaliação clínica e de todos os estudos laboratoriais.

Após a caracterização descritiva da amostra foram analisadas possíveis associações entre as variáveis de interesse (TDR malária, TDR chikungunya e TDR dengue) e as variáveis demográficas e clínicas consideradas no estudo usando o teste do qui-quadrado, testes para proporções e testes (paramétricos ou não paramétricos) de comparação de populações. No sentido de quantificar a contribuição das variáveis que se revelaram associadas com as variáveis de interesse, foram construídos modelos de regressão logística univariados. Todos os procedimentos foram realizados nos programas estatísticos SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 24, e SAS-JMP (*Statistical Analysis System - John's Macintosh Project*), versão 12.

2.8. Considerações éticas e legais

Este estudo foi integrado no protocolo de pesquisa do projecto previamente aprovado pelo Comité de Ética do Ministério da Saúde de Angola e designado de “Diagnóstico Diferencial de Síndromes Febris Suspeitos de Malária” da responsabilidade do Departamento Nacional de Controlo de Doenças, da Direcção Nacional de Saúde Pública, do Ministério da Saúde da República de Angola (Anexo nº 1).

Foram respeitados os princípios éticos básicos, que incluíram:

- a autonomia e a autodeterminação dos participantes, garantidas pelo termo de consentimento livre e esclarecido, bem como pela protecção a grupos vulneráveis e a pessoas legalmente incapazes;
- a beneficência, assegurada pela possibilidade de um potencial benefício da investigação, resultante de um diagnóstico laboratorial atempado, prevenindo danos e riscos;
- a não-maleficência, afirmando-se o compromisso de não causar danos resultantes da investigação;
- a justiça, justificada pela relevância social do estudo e pela acção humanitária na prestação de cuidados aos participantes;
- a privacidade e confidencialidade, implícita no critério da autonomia e proporcionada pela preservação das informações obtidas durante o estudo.

Todos os participantes ou os seus representantes legais ou acompanhantes maiores de idade foram elucidados verbalmente sobre os objectivos, métodos, benefícios e eventuais riscos resultantes da participação voluntária no estudo. Seguidamente, a equipa de investigação, que incluiu, a nível local, sempre que necessário, um profissional de saúde tradutor e intérprete de língua umbundo, solicitou a assinatura ou a impressão digital, no caso de iliteracia, do termo de consentimento livre e esclarecido. Posteriormente, conduziu-se o restante protocolo de estudo, incluindo a colheita de dados e de amostras biológicas.

Não existiram quaisquer conflitos de interesse, nem compensações monetárias, na concepção e execução desta investigação, apesar da sua componente multicêntrica com

o envolvimento de várias instituições de saúde angolanas e portuguesas, bem como da componente multidisciplinar com a participação de profissionais de saúde de distintas áreas de formação e de actuação.

2.9. Fluxograma de actuação

O fluxograma seguinte resume a abordagem clínica e laboratorial do protocolo do estudo.

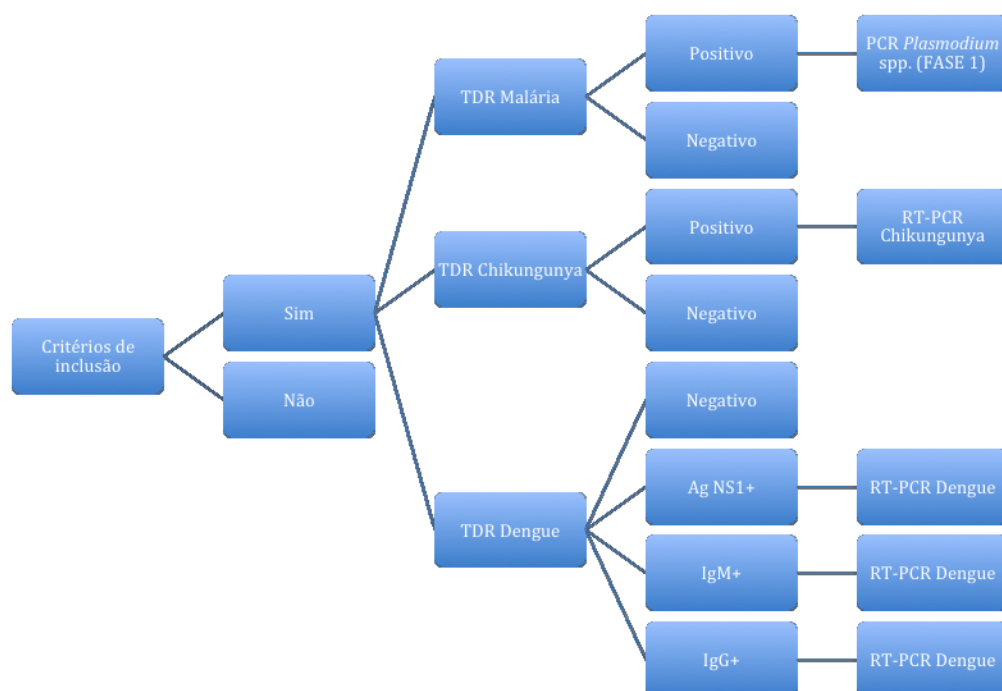


Figura 5: Fluxograma de actuação.

3. RESULTADOS

3.1. Província do Huambo (Fase 1)

3.1.1. Caracterização da amostra

Nesta primeira fase do estudo foram avaliados 242 doentes com síndrome febril suspeita de malária na província do Huambo durante o período compreendido entre 20 de Fevereiro e 11 de Abril do ano de 2012.

A distribuição das unidades sanitárias seleccionadas por ordem decrescente da inclusão de doentes foi a seguinte:

- Centro de Saúde do Casseque (n=64; 26,4%);
- Hospital Municipal da Caála (n=56; 23,1%);
- Hospital Municipal do Alto-Hama (n=35; 14,5%);
- Centro de Saúde da Calenga (n=34; 14%);
- Centro de Saúde Materno-infantil da Mineira (n=32; 13,2%);
- Hospital Municipal do Bailundo (n=11; 4,5%);
- Hospital da Missão Evangélica do Chilume (n=10; 4,1%);

Foram incluídos 39,7% (n=96) dos doentes em unidades sanitárias do município do Huambo e 60,3% (n=146) nos restantes municípios (Caála, Lenduimbali e Bailundo).

Relativamente ao município de residência verificou-se a seguinte distribuição:

- Huambo (n=93; 38,4%);
- Caála (n=89; 36,8%);
- Lenduimbali (n=32; 13,2%);
- Bailundo (n=20; 8,3%);
- Ecunha (n=5; 2,1%);
- Cassongue, município da província do Cuanza-Sul limítrofe com o município do Lenduimbali da província do Huambo (n=2; 0,8%);
- Mungo (n=1; 0,4%);

Resultados

A categorização por género revelou um claro predomínio do sexo feminino (n=145; 59,9%).

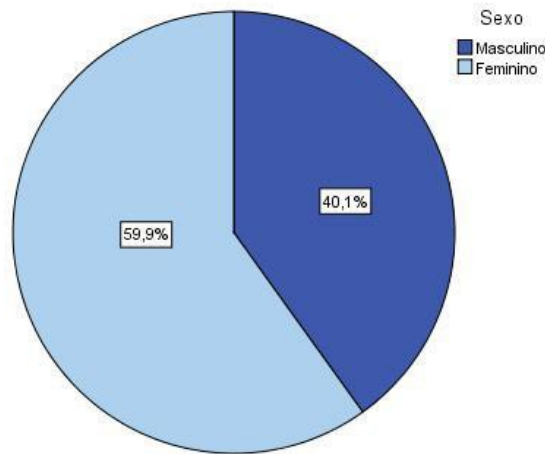


Figura 6: Distribuição por género da amostra da província do Huambo.

Destaca-se que 14 mulheres estavam grávidas, das quais 8 no primeiro, 3 no segundo e as restantes 3 no terceiro trimestre de gestação.

A média de idades foi de 16 anos no total da amostra, sendo de 11 anos no sexo masculino e de 19 anos no sexo feminino (figuras 7 e 8). As idades encontravam-se compreendidas entre os zero e os 72 anos. A população adulta com idade igual ou superior a 18 anos constituiu 41,3% (n=100) da amostra global. A maioria (58,3%; n=141) possuía idade igual ou inferior a 15 anos e apenas um doente tinha idade compreendida entre os 15 anos e os 18 anos.

Resultados

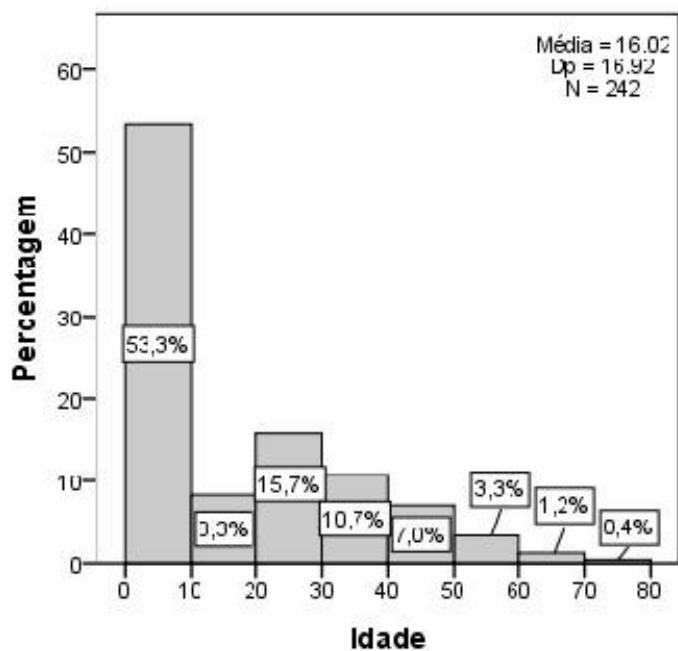


Figura 7: Distribuição etária da amostra da província do Huambo.

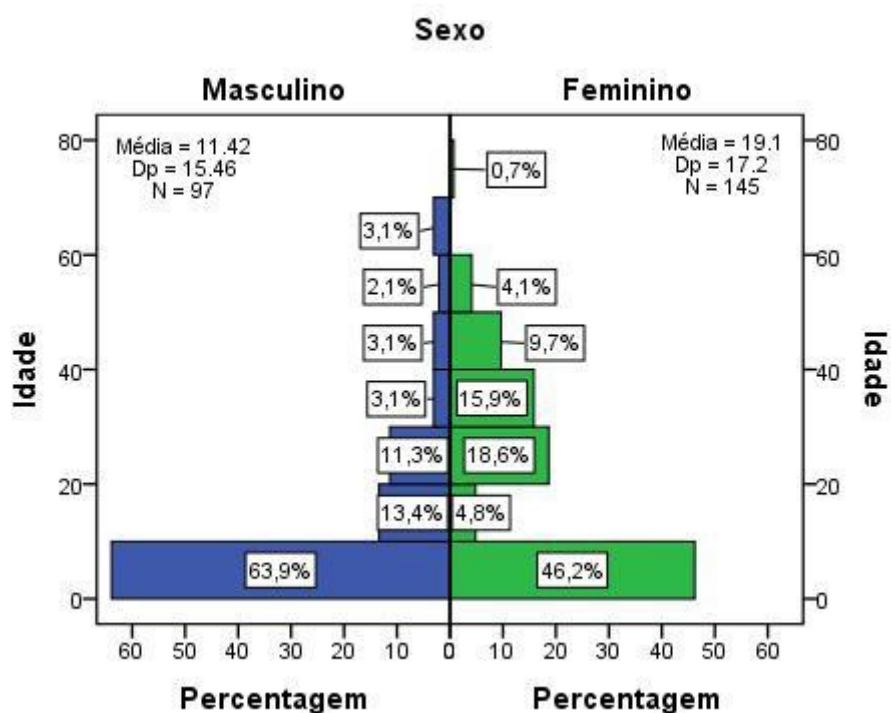


Figura 8: Distribuição etária por género da amostra da província do Huambo.

Resultados

Verificou-se um predomínio do nível primário da escolaridade (n=63; 26%), seguido da iliteracia (n=36; 14,9%) e do nível secundário e/ou superior (n=23; 9,5%). Os restantes 120 doentes (49,6%) foram classificados como tendo um nível de escolaridade “não aplicável” devido à idade ser igual ou inferior a seis anos.

Desempenhavam uma actividade profissional 102 doentes com idade igual ou superior a quinze anos, salientando-se um predomínio de trabalhadores não qualificados (tabela 2).

Profissão		
	Frequência	Percentagem
Administrador	1	1,0
Auxiliar de limpeza hospitalar	1	1,0
Barbeiro	1	1,0
Camponês	45	44,1
Desempregado	1	1,0
Doméstica	1	1,0
Empregado limpeza	4	3,9
Estudante	7	6,9
Ferreiro	1	1,0
Lavadeira	3	2,9
Marceneiro	1	1,0
Pedreiro	3	2,9
Peixeira	1	1,0
Porteiro hospitalar	1	1,0
Professor	3	2,9
Secretária	1	1,0
Taxista	2	2,0
Transportadora de areia	1	1,0
Tropa	1	1,0
Vendedor	23	22,5
Total	102	100,0

Tabela 2: Profissões dos doentes da amostra da província do Huambo.

Foram ainda recolhidas informações relativamente a condições habitacionais e de actividades no ambiente doméstico e peridoméstico. Deste modo destacam-se as seguintes particularidades:

- Tipo de habitação
 - Com tijolo de adobe (terra crua, água e palha e/ou outras fibras naturais)
 - n=219 (90,5%)

Resultados

- Alvenaria com blocos cerâmicos e/ou blocos de cimento
 - n=23 (9,5%).
- O número médio de divisões da habitação foi de quatro (figura 9).

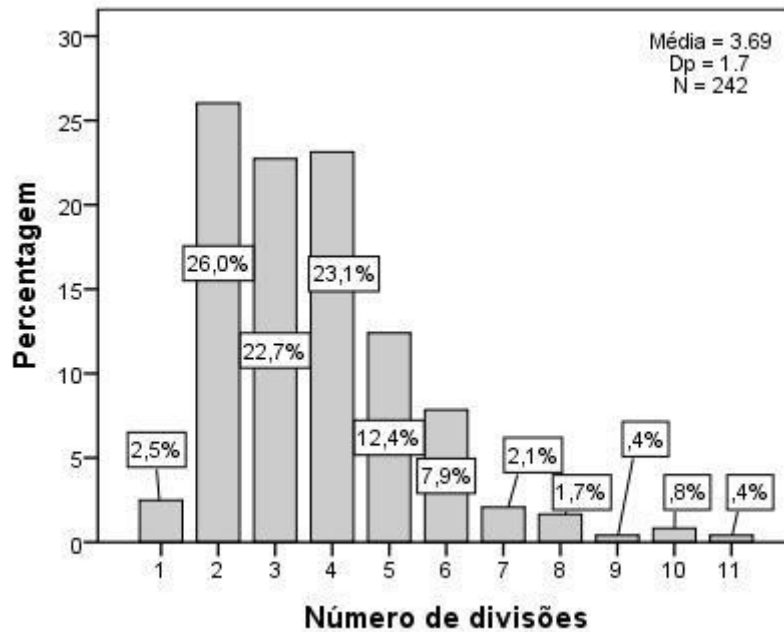


Figura 9: Distribuição do número de divisões por habitação na amostra da província do Huambo.

- Os agregados familiares eram constituídos em média por seis elementos (figura 10).

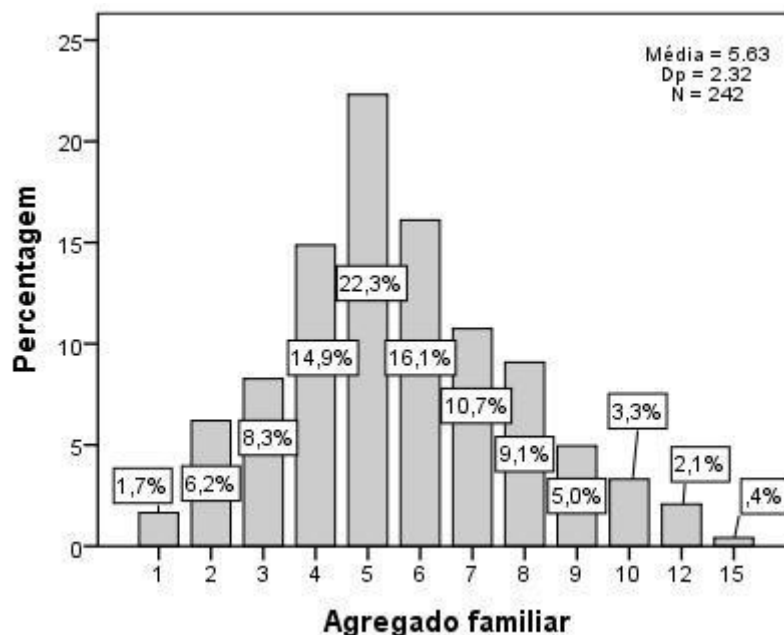


Figura 10: Distribuição do número de elementos por agregado familiar na amostra da província do Huambo.

- A larga maioria (n=237; 97,9%) das habitações possuía latrina e/ou casa de banho.
- Existia canalização de água em 10,7% (n=26) das habitações, destacando-se o armazenamento de água em recipientes em 85,1% (n=206) das habitações.
- A água utilizada nos domicílios provinha das seguintes fontes:
 - cacimba – poço de água potável (n=123; 50,8%);
 - chafariz (n=46; 19%);
 - rio (n=43; 17,8%);
 - rede pública (n=27; 11,2%);
 - tanque de água comprada (n=3; 1,2%);
- A presença de rede de esgoto no domicílio foi reportada em apenas 3,7% (n=9) dos casos.

Resultados

- A maioria (50,4%; n=122) das habitações possuía energia eléctrica, tendo sido considerado neste item a utilização de geradores.
- A posse de redes mosquiteiras no domicílio foi mencionada em 64,5% (n=156) dos casos. Destes, 20 doentes referiram a sua não utilização na noite anterior à inclusão do estudo.
- A utilização de insecticidas domiciliareos foi referida em 38,8% (n=94).
- A maioria (59,9%; n=145) dos doentes tinha contacto com animais domésticos de companhia e/ou de produção de alimentos ou de transporte.
- As actividades de lavoura foram mencionadas em 58,3% (n=141) dos doentes.
- As actividades recreativas em rios foram reportadas em 29,3% (n=71).

As figuras seguintes ilustram alguns enquadramentos habitacionais da população estudada na província do Huambo:



Figura 11: Cidade do Huambo (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Março 2012*).



Figura 12: Comuna da Calenga, município da Caála com habitações de abobe (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Março 2012*).



Figura 13: Aglomerado populacional no município do Londuimbali (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Março 2012*).

Relativamente à história de viagens nas três semanas prévias à data de entrada no estudo não se verificaram casos de viagens internacionais. Contudo, onze (4,5%) doentes reportaram viagens interprovinciais por via terrestre [Luanda (n=3), Benguela (n=2), Cuanza-Sul (n=2), Huíla (n=2), Bié (n=1) e Malanje (n=1)].

De um total de 118 (48,8%) doentes que mencionaram terem realizado pelo menos uma vez na vida a vacina contra a febre amarela, apenas três referiram a sua administração no último mês. Dos restantes, 120 (49,6%) negaram e 4 (1,7%) desconheciam a realização desta vacina.

Apenas um (0,4%) doente referiu ter antecedentes de transfusão sanguínea nos últimos 90 dias.

No que concerne a utilização de antibióticos e ou antiparasitários no dia de entrada no estudo, destaca-se esta particularidade em 33 (13,6%) doentes, três dos quais sob antipalúdicos (arteméter/lumefantrina). Salienta-se ainda que 40 (16,5%) doentes referiram terem tido um diagnóstico de malária nos últimos três meses e 51 (21,1%) doentes mencionaram a ocorrência de pelo menos um episódio de febre no mesmo período temporal.

No momento de entrada no estudo, 77 (31,8%) apresentavam uma temperatura corporal igual ou superior a 37,5 °C.

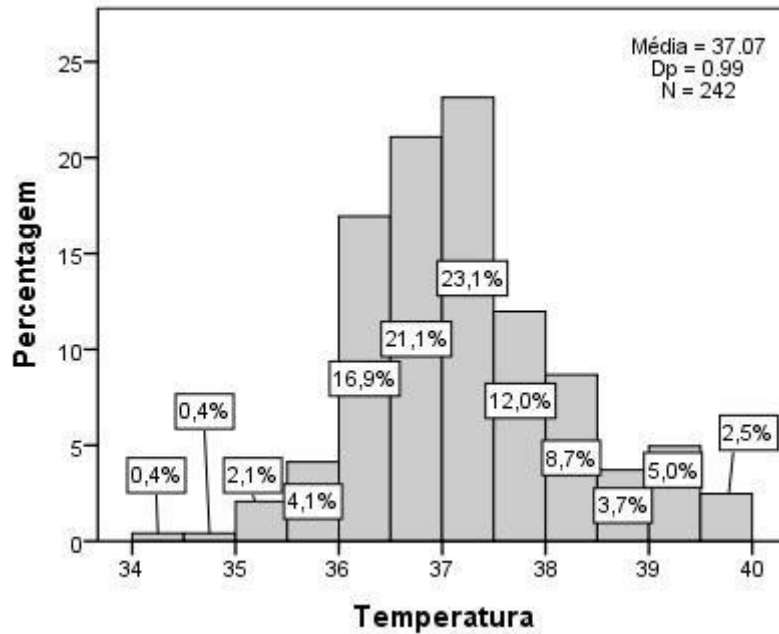


Figura 14: Distribuição da temperatura corporal (°C) avaliada no momento de inclusão no estudo na amostra da província do Huambo.

A febre foi reportada como tendo uma evolução média de 4 dias, com valores extremos de zero e de 60 dias. O gráfico seguinte ilustra o início da febre em número de dias.

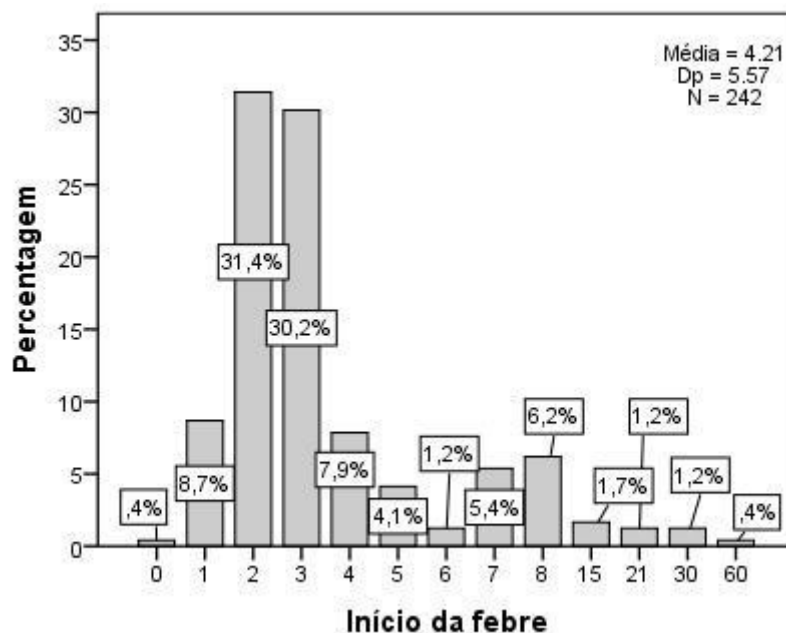


Figura 15: Distribuição do tempo (em dias) decorrido desde o início da febre na amostra da província do Huambo.

Resultados

As tabelas seguintes exibem a sintomatologia e os achados mais relevantes ao exame objectivo dos doentes incluídos nesta fase do estudo.

SINTOMATOLOGIA (n=242)	SIM n (%)	NÃO n (%)
Tosse	147 (60,7%)	95 (39,3%)
Corrimento nasal	117 (48,3%)	125 (51,7%)
Cefaleias	97 (40,1%)	145 (59,9%)
Dores abdominais	88 (36,4%)	154 (63,6%)
Artralgias	82 (33,9%)	160 (66,1%)
Mialgias	74 (30,6%)	168 (69,4%)
Anorexia	57 (23,6%)	185 (76,4%)
Diarreia	56 (23,1%)	186 (76,9%)
Vómitos	40 (16,5%)	202 (83,5%)
Diarreia com muco	31 (12,8%)	25 (10,3%)
Astenia	23 (9,5%)	219 (90,5%)
Náuseas	21 (8,7%)	221 (91,3%)
Lesões cutâneas	9 (3,7%)	233 (96,3%)
Dispneia	8 (3,3%)	234 (96,7%)
Hemorragias	7 (2,9%)	235 (97,1%)
Diarreia com sangue	5 (2,1%)	51 (21,1%)
Prurido	5 (2,1%)	237 (97,9%)
Dores retro-oculares	3 (1,2%)	239 (98,8%)
Convulsões	2 (0,8%)	240 (99,2%)

Obnubilação	2 (0,8%)	240 (99,2%)
Alteração do gosto	0 (0%)	242 (100%)
Alterações visuais	0 (0%)	242 (100%)

Tabela 3: Sintomatologia registada nos doentes da amostra da província do Huambo.

A clínica respiratória, nomeadamente a tosse (60,7%) e o corrimento nasal (48,3%), foi a mais mencionada seguida das queixas álgicas: cefaleias (40,1%), dores abdominais (36,4%), artralgias (33,9%) e mialgias (30,6%).

As hemorragias reportadas foram as epistaxis (n=4), as meno e/ou metrorragias (n=2) e as hemoptises (n=1).

EXAME OBJECTIVO	SIM n (%)	NÃO n (%)
Palidez cutâneo-mucosa	33 (13,6%)	209 (86,4%)
Auscultação pulmonar anormal	20 (8,3%)	222 (91,7%)
Exantema	9 (3,7%)	233 (96,3%)
Sufusão conjuntival	4 (1,7%)	238 (98,3%)
Hepatomegália	2 (0,8%)	240 (99,2%)
Coma	1 (0,4%)	241 (99,6%)
Sinais meníngeos	1 (0,4%)	241 (99,6%)
Adenomegalias	1 (0,4%)	241 (99,6%)
Icterícia	0 (0%)	242 (100%)
Auscultação cardíaca anormal	0 (0%)	242 (100%)
Esplenomegália	0 (0%)	242 (100%)
Edemas	0 (0%)	242 (100%)
Choque	0 (0%)	242 (100%)

Tabela 4: Alterações no exame objectivo registadas nos doentes da amostra da província do Huambo.

Resultados

A principal alteração do exame objectivo foi a presença de palidez cutâneo-mucosa (13,6%). Realça-se que apenas em 48 casos existiam registos da determinação laboratorial do valor da hemoglobina e que em 36 se constatou a presença de anemia, definida como um valor inferior a 12 g/dl em mulheres ou a 10 g/dl no caso de gestação ou a 13 g/dl em homens.

Verificaram-se oito casos de exantema maculopapular, sendo generalizado a todo o tegumento cutâneo em seis casos e limitado ao tronco num caso e aos membros superiores noutro caso. Ocorreu ainda um caso de exantema papulovesicular nos membros superiores.

As alterações constatadas na auscultação pulmonar foram maioritariamente (n=18) a presença de ruídos adventícios (roncos, sibilos e/ou fervores) seguido da diminuição do murmúrio vesicular (n=2).

Ocorreu um caso de malária cerebral apresentando-se em coma superficial com um valor de 11 na escala de coma de Glasgow mas com sinais de irritação meníngea.

Todos os doentes foram submetidos a TDR e obtiveram-se os seguintes resultados:

- TDR para malária: 5 (2,1%) casos, todos positivos para *Plasmodium falciparum* e confirmados por microscopia óptica;
- TDR para chikungunya: 4 (1,7%) casos;
- TDR para dengue: 2 (0,8%) casos, ambos somente com positividade para Ag NS1;
- Verificou-se um caso com positividade concomitante no TDR para dengue (Ag NS1+) e no TDR para chikungunya.

A pesquisa de *Plasmodium* spp. por microscopia óptica foi realizada em 232 (95,9%) casos por técnicos de laboratório a nível local. Em 18,1% (n=42) dos casos avaliados o resultado foi dado como positivo, tendo sido observadas somente formas de *Plasmodium falciparum*. A avaliação destas últimas amostras por PCR para

Resultados

Plasmodium spp., revelou-se positiva para *Plasmodium falciparum* em apenas quatro casos, todos com positividade no TDR. Não se registaram casos de identificação de outras espécies de *Plasmodium*.

Salienta-se a ocorrência de um caso com positividade para *Plasmodium falciparum* no TDR, confirmado por microscopia óptica mas com resultado negativo por PCR. Acrescenta-se que não houve referência a tratamento recente de malária.

As técnicas de RT-PCR para chikungunya e para dengue nas amostras com TDR positivo para estes agentes foram negativas.

Após a inclusão do estudo ocorreu nesse mesmo dia o internamento em 27 (11,2%) casos, tendo os restantes alta para o domicílio.

Os diagnósticos mais frequentes registados pela equipa clínica local foram os seguintes:

- Síndroma gripal (n=65; 26,9%);
- Diarreia bacteriana aguda (n=43; 17,8%);
- Malária (n=41; 16,9%);
- Doença respiratória aguda (n=37; 15,3%);
- Síndroma febril (n=12; 5%);
- Outros (n=44; 18,1%);

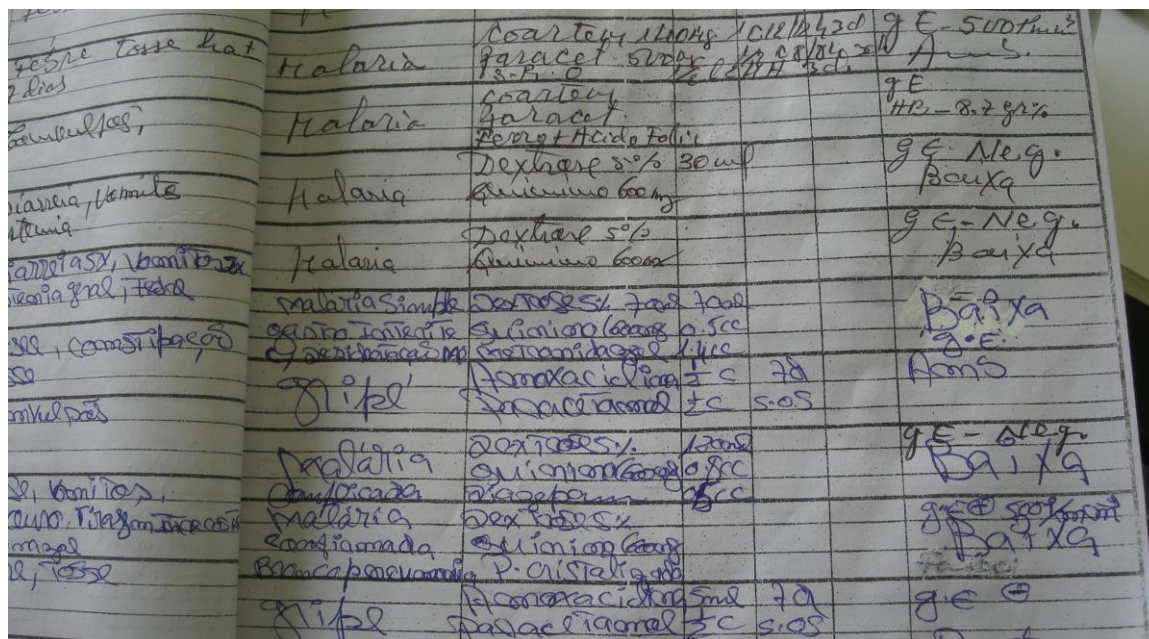


Figura 16: Livro de registos da alta do Hospital Municipal do Bailundo onde constam alguns exemplos de registos como “malária” com gota espessa negativa, “malária complicada” com gota espessa negativa e “malária confirmada” (Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Março 2012).

3.1.2. Caracterização da subamostra com TDR positivo para malária

Na tabela seguinte apresentam-se somente as características cuja associação com TDR malária foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Para cada uma delas, as modalidades (Não/Sim, Negativa/Positiva) que correspondem a proporções significativamente diferentes nas duas subamostras (TDR malária negativo/TDR malária positivo) estão assinaladas a negrito. A tabela com caracterização da maioria das variáveis encontra-se no Anexo nº 2 (tabela A).

Variáveis	TDR Malária Negativo (n = 237)	TDR Malária Positivo (n = 5)	p
Viagens			0.017
Sim	9 (3.8%)	2 (40%)	
Não	228 (96.2%)	3 (60%)	
Mialgias			0.032

	Não	167 (70.5%)	1 (20%)	
	Sim	70 (29.5%)	4 (80%)	
Água armazenada casa				0.025
	Não	33 (13.9%)	3 (60%)	
	Sim	204 (86.1%)	2 (40%)	
Microscopia óptica				< 0.001
	Negativa	190 (83.7%)	0 (0%)	
	Positiva	37 (16.3%)	5 (100%)	

Tabela 5: Variáveis cuja associação com TDR malária foi estatisticamente significativa na amostra da província do Huambo.

Relativamente à história de viagens, presente em dois doentes com TDR positivo para malária, salienta-se que um regressou 7 dias antes da inclusão no estudo de uma estadia de 3 anos na cidade de Luanda e o outro regressou 4 dias antes da admissão no estudo de uma estadia de 3 semanas no município da Matala na província da Huíla.

Para as variáveis que se revelaram associadas com TDR malária foi realizada uma análise de regressão logística univariada com ajustamento de Firth a fim de quantificar a intensidade dessa associação (tabela 6).

Variáveis	<i>p</i>	OR	95% IC
Viagens SIM / NÃO	0.004	16.949	2.5 – 111.111
Mialgias SIM / NÃO	0.045	9.543	1.048 – 86.903
Tipo de habitação Adobe / Alvenaria	0.041	0.146	0.023 – 0.922
Água armazenada casa SIM / NÃO	0.017	0.108	0.017 – 0.670
Microscopia óptica Positiva / Negativa	< 0.0001	55.88	2.995 – 1042.697
Alta NÃO / SIM	0.065	5.653	0.901 – 35.475

Tabela 6: Resultados da análise de regressão logística univariada para as variáveis cuja associação com TDR malária foi estatisticamente significativa na amostra da província do Huambo.

3.1.3. Caracterização da subamostra com TDR positivo para chikungunya

Na tabela seguinte apresentam-se somente as características cuja associação com TDR chikungunya foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Para cada uma delas, as modalidades (Não/Sim, Negativa/Positiva) que correspondem a proporções significativamente diferentes nas duas subamostras (TDR chikungunya negativo/TDR chikungunya positivo) estão assinaladas a negrito. A tabela com caracterização da maioria das variáveis encontra-se no Anexo nº 2 (tabela B).

Variáveis	TDR Chikungunya Negativo (n = 238)	TDR Chikungunya Positivo (n = 4)	<i>p</i>
TDR Dengue			0.033
Negativo	237 (99.6%)	3 (75%)	
Positivo	1 (0.4%)	1 (25%)	

Tabela 7: Variáveis cuja associação com TDR chikungunya foi estatisticamente significativa na amostra da província do Huambo.

Para as variáveis que se revelaram associadas com TDR chikungunya foi realizada uma análise de regressão logística univariada com ajustamento de Firth a fim de quantificar a intensidade dessa associação (tabela 8).

Variáveis	<i>p</i>	OR	95% IC
Município Huambo / Restantes municípios	0.011	14.254	0.751 – 270.677
Água canalizada NÃO / SIM	0.032	0.112	0.015 – 0.833
TDR Dengue (2 casos positivos) Positivo / Negativo	0.004	79	3.947 – 1581.372

Tabela 8: Resultados da análise de regressão logística univariada para as variáveis cuja associação com TDR chikungunya foi estatisticamente significativa na amostra da província do Huambo.

3.1.4. Caracterização da subamostra com TDR positivo para dengue

A caracterização dos dois casos positivos para dengue, ambos com Ag NS1 detectável encontra-se sumariada na seguinte tabela.

	Doente nº 1	Doente nº 2
Unidade Sanitária	Bailundo	Mineira
Sexo	Feminino	Feminino
Gravidez	Ausente	Ausente
Idade (anos)	37	27
Escolaridade	Analfabeta	Primária
Profissão	Camponesa	Empregada de limpeza
Tipo habitação	Adobe	Adobe
Número de divisões	3	3
Agregado familiar	7	4
Água armazenada	Sim	Não
Origem da água	Chafariz	Rede pública
Animais domésticos	Sim	Sim
Actividades lavoura	Sim	Não
Actividades rio	Sim	Sim
Vacina febre amarela	Sim	Não
Vacina febre amarela no último mês	Não	Não aplicável
Malária últimos 3 meses	Sim	Não
Temperatura à admissão	37,2 °C	36,8 °C
Duração da febre (dias)	2	3
Mialgias	Sim	Não

Artralgias	Sim	Sim
Cefaleias	Sim	Não
Dores abdominais	Não	Sim
Anorexia	Não	Sim
Exantema	Não	Não
TDR malária	Negativo	Negativo
Microscopia óptica	Negativa	Negativa
TDR chikungunya	Negativo	Positivo
Alta para domicílio	Sim	Sim
Diagnóstico de alta	Síndrome gripal	Síndrome gripal

Tabela 9: Caracterização dos dois casos com Ag NS1 detectável no TDR para dengue na província do Huambo.

3.1.5. Caracterização das subamostras com prováveis co-infecções

Ocorreu apenas um caso com uma provável co-infecção por dengue (Ag NS1+) e chikungunya (IgM+) e que já foi caracterizado previamente (doente nº 2 descrito na tabela 9).

3.2. Província de Benguela (Fase 2)

3.2.1. Caracterização da amostra

Nesta segunda fase do estudo foram avaliados 300 doentes com síndrome febril suspeita de malária na província de Benguela durante o período temporal de 20 de Maio a 4 de Junho do ano de 2015.

A distribuição das unidades sanitárias seleccionadas por ordem decrescente da inclusão de doentes foi a seguinte:

- Hospital Municipal do Chongoroi (n=146; 48,7%);

Resultados

- Hospital Municipal da Catumbela (n=100; 33,3%);
- Centro de Saúde do Senje (n=54; 18%);

Foram incluídos 66,7% (n=200) dos doentes em unidades sanitárias do município do Chongoroi no interior da província de Benguela e 33,3% (n=100) no município da Catumbela que se localiza na região litoral da mesma província.

Relativamente ao município de residência verificou-se a seguinte distribuição:

- Chongoroi (n=197; 65,7%);
- Catumbela (n=78; 26%);
- Lobito (n=20; 6,7%);
- Benguela (n=3; 1%);
- Quilengues, município da província da Huíla confinante com o município do Chongoroi da província de Benguela (n=2; 0,7%);

A ordenação por género revelou um claro predomínio do sexo feminino (n=183; 61%).

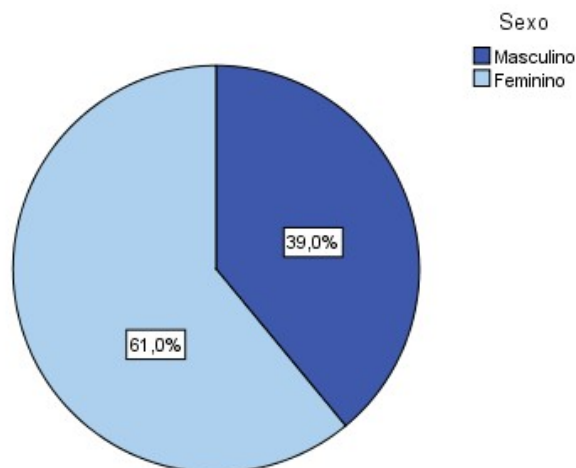


Figura 17: Distribuição por género da amostra da província de Benguela.

Encontravam-se grávidas 15 (8,2%) mulheres (7 no primeiro, 4 no segundo e as restantes 4 no terceiro trimestre de gestação).

Resultados

A média de idades foi de 19 anos no total da amostra, sendo de 16 anos no sexo masculino e de 21 anos no sexo feminino (figuras 18 e 19). As idades encontravam-se compreendidas entre os zero e os 74 anos. A população adulta com idade igual ou superior a 18 anos constituiu 41,7% (n=125) da amostra global. A maioria (56%; n=168) possuía idade igual ou inferior a 15 anos e apenas sete doentes tinham idade compreendida entre os 15 anos e os 18 anos.

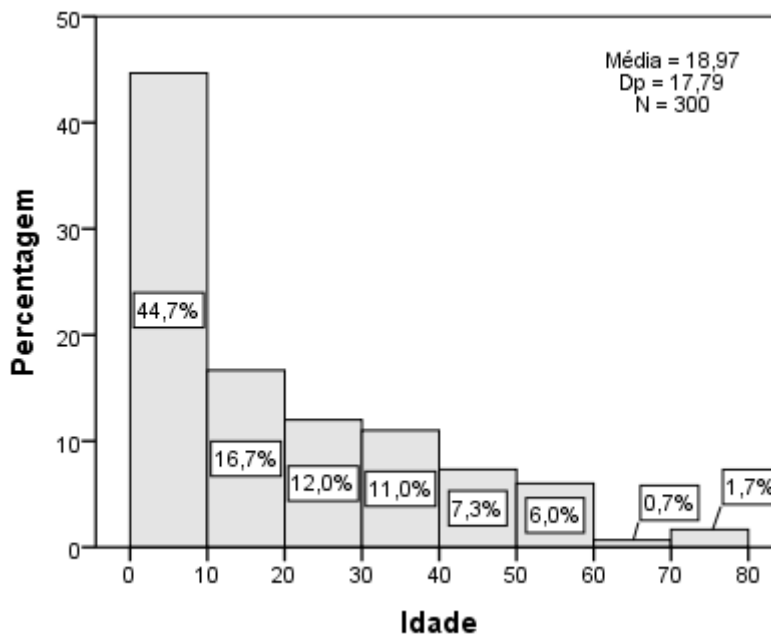


Figura 18: Distribuição etária da amostra da província de Benguela.

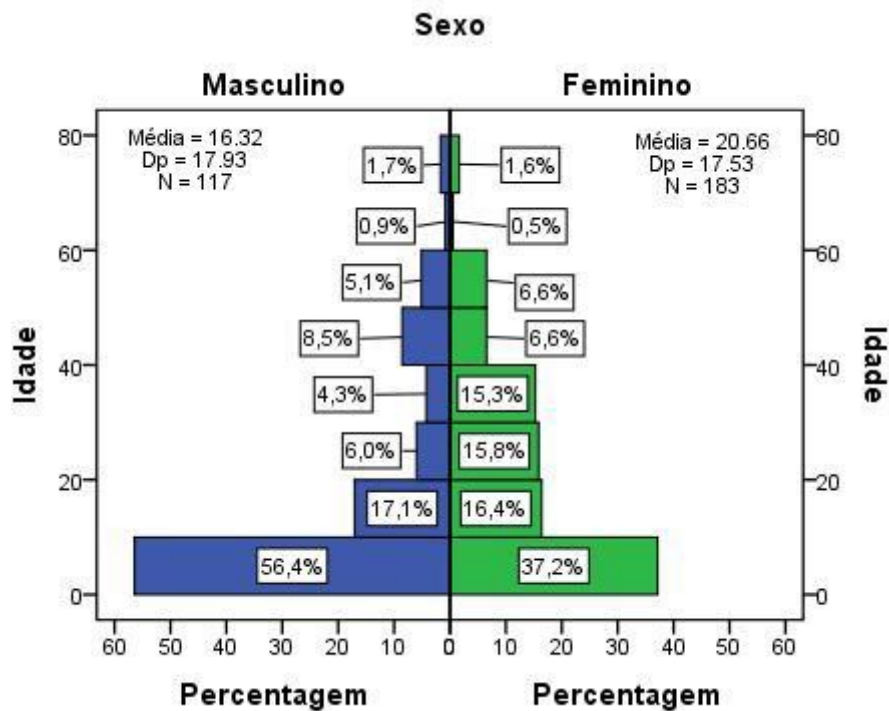


Figura 19: Distribuição etária por género da amostra da província de Benguela.

Verificou-se um predomínio do nível primário da escolaridade (n=107; 35,7%), seguido da iliteracia (n=60; 20%) e do nível secundário e/ou superior (n=34; 11,3%). Os restantes 99 doentes (33%) foram classificados como tendo um nível de escolaridade “não aplicável” devido à idade ser igual ou inferior a seis anos.

Desempenhavam uma actividade profissional 135 doentes com idade igual ou superior a quinze anos, na sua maioria trabalhadores não qualificados (tabela 10).

Resultados

Profissão		
	Frequência	Porcentagem
Desempregado	3	2,2
Aposentado	2	1,5
Administrativa	2	1,5
Ajudante de cozinha	1	,7
Auxiliar de limpeza	1	,7
Bombeira	1	,7
Cabeleireira	1	,7
Camponês	46	34,1
Carpinteiro	1	,7
Doméstica	25	18,5
Empresário	1	,7
Enfermeira	1	,7
Estatística	2	1,5
Estudante	17	12,6
Herbanário	1	,7
Hoteleiro	1	,7
Nutricionista	1	,7
Pedreiro	1	,7
Pescador	1	,7
Professor	7	5,2
Soldador	1	,7
Técnico de enfermagem	1	,7
Técnico de laboratório	4	3,0
Vendedora	13	9,6
Total	135	100,0

Tabela 10: Profissões dos doentes da amostra da província de Benguela.

Relativamente às condições habitacionais e de actividades no ambiente doméstico e peridoméstico, destacam-se as seguintes particularidades:

- Tipo de habitação
 - Pau-a-pique (entrelaçamento de madeiras verticais fixadas no solo com vigas horizontais e com os vãos preenchidos com barro)
 - n=116 (38,7%)
 - Com tijolo de adobe
 - n=104 (34,7%)
 - Alvenaria com blocos cerâmicos e/ou blocos de cimento
 - n=77 (25,7%)

Resultados

- Chapa de zinco com telhado de capim
 - $n=3$ (1%).
- A maioria (78,7%) das habitações possuía um número de divisões igual ou inferior a 3 (figura 20).

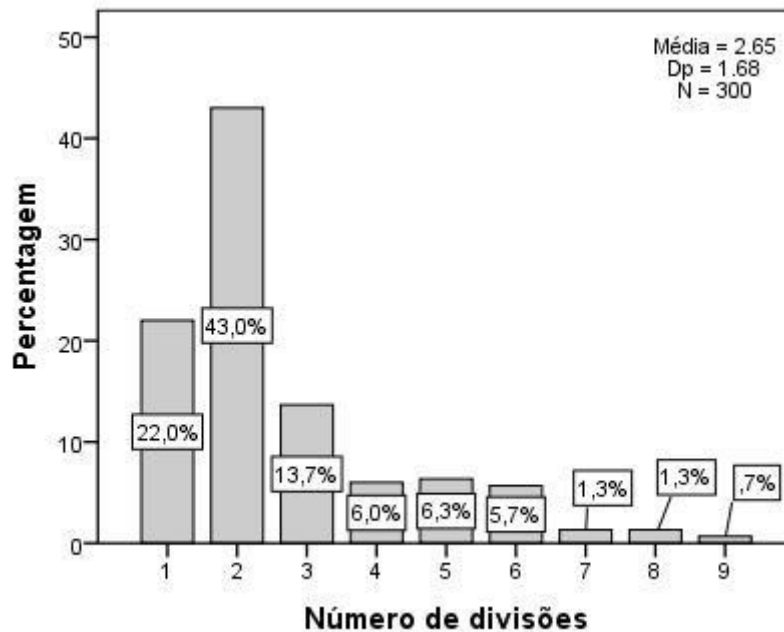


Figura 20: Número de divisões das habitações da amostra na província de Benguela.

- Os agregados familiares eram constituídos em média por seis elementos (figura 21).

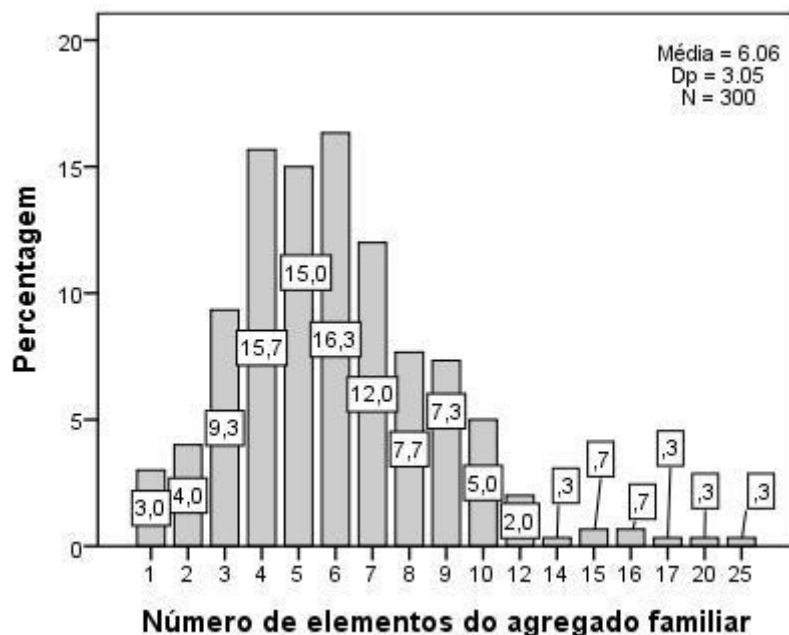


Figura 21: Distribuição do número de elementos do agregado familiar na amostra da província de Benguela.

- A maioria (n=160; 53,3%) das habitações não possuía latrina e/ou casa de banho.
- Existia canalização de água em 33,3% (n=100) das habitações, destacando-se o armazenamento de água em recipientes em 67,3% (n=202) das habitações.
- A água utilizada nos domicílios provinha das seguintes fontes:
 - rede pública (n=102; 34%);
 - rio (n=96; 32%);
 - chafariz (n=82; 27,3%);
 - cacimba – poço de água potável (n=17; 5,7%);
 - tanque de água comprada (n=3; 1%);
- A presença de rede de esgoto no domicílio foi reportada 31% (n=93) dos casos.
- A maioria (62,3%; n=187) das habitações não possuía energia eléctrica nem utilizava geradores.

Resultados

- A posse de redes mosquiteiras no domicílio foi mencionada em 30,3% (n=91) dos casos. Destes, 28 doentes referiram a sua não utilização na noite anterior à inclusão do estudo.
- Nenhum participante reportou a utilização de insecticidas domiciliare.
- A maioria (61%; n=183) dos doentes tinha contacto com animais domésticos de companhia e/ou de produção de alimentos ou de transporte.
- As actividades de lavoura foram mencionadas em 73,3% (n=220) dos doentes.
- As actividades recreativas em rios foram reportadas em 44% (n=132).

As figuras seguintes ilustram alguns enquadramentos habitacionais da população estudada na província de Benguela:



Figura 22: Vila do Chongoroi onde são visíveis, da esquerda para a direita, habitações de alvenaria, pau-a-pique e de adobe (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Maio 2015*).



Figura 23: Habitação tipo pau-a-pique na periferia da Vila do Chongoroi (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Maio 2015*).

Resultados



Figura 24: Paisagem natural da Vila do Chongoroi (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Maio 2015*).



Figura 25: Catumbela (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Maio 2015*).



Figura 26: Vila da Catumbela na margem direita do rio Catumbela (*Fonte: Arquivo pessoal do investigador, Maio 2015*).

Relativamente à história de viagens nas três semanas prévias à data de entrada no estudo não se verificaram casos de viagens internacionais. Contudo, dezassete (5,7%) doentes reportaram viagens. Identificaram-se viagens interprovinciais por via terrestre [Huíla

Resultados

(n=4), Luanda (n=2), Cuanza-Norte (n=1) e Huambo (n=1)], bem como viagens dentro da província de Benguela (n=9).

Quando questionados sobre a imunização contra a febre amarela, todos os participantes negaram antecedentes da sua administração.

Registaram-se antecedentes de transfusão sanguínea nos últimos 90 dias em sete (2,3%) doentes.

No dia de inclusão no estudo encontravam-se medicados com antibióticos e ou antiparasitários onze (3,7%) doentes, nove dos quais sob antipalúdicos (arteméter/lumefantrina). Salienta-se ainda que 17 (5,7%) doentes referiram terem tido um diagnóstico de malária nos últimos três meses e 20 (6,7%) doentes mencionaram a ocorrência de pelo menos um episódio de febre no mesmo período temporal.

No dia de recrutamento desta fase do estudo, 79 (26,3%) doentes possuíam uma temperatura corporal igual ou superior a 37,5 °C.

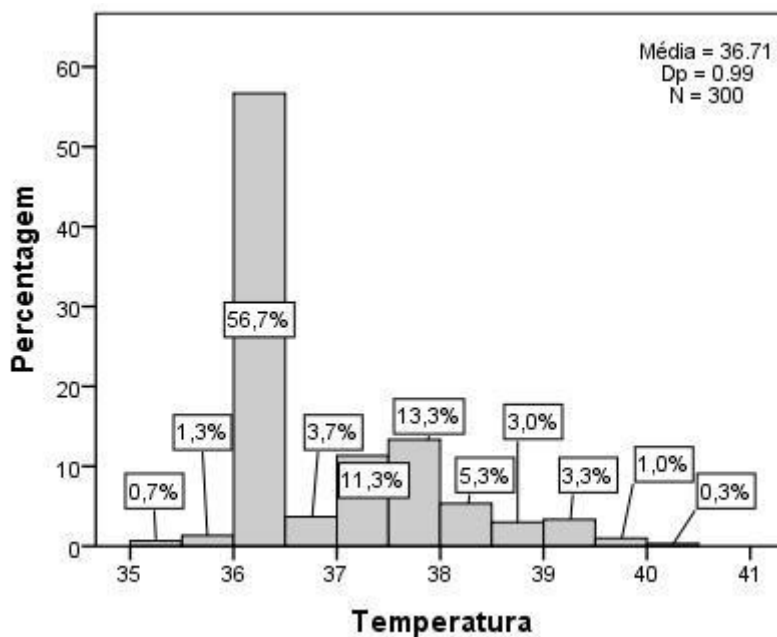


Figura 27: Distribuição da temperatura corporal (°C) avaliada no momento de inclusão no estudo na amostra da província de Benguela.

Resultados

A febre foi reportada como tendo uma evolução média de 4,5 dias, com valores extremos de um e de 30 dias. A figura seguinte ilustra o início da febre em número de dias.

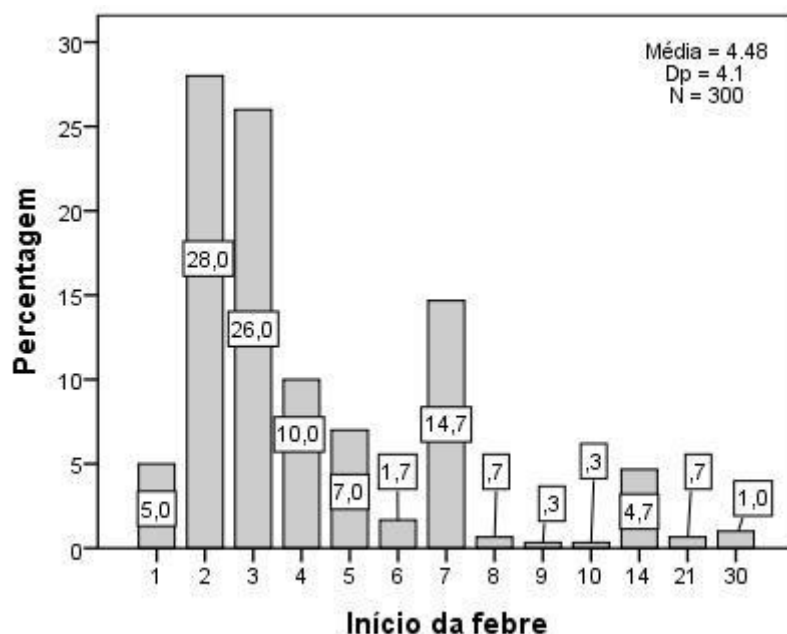


Figura 28: Distribuição do tempo (em dias) decorrido desde o início da febre na amostra da província de Benguela.

As tabelas seguintes apresentam a sintomatologia e os achados mais relevantes ao exame objectivo dos doentes incluídos nesta fase do estudo.

SINTOMATOLOGIA (n=300)	SIM n (%)	NÃO n (%)
Cefaleias	159 (53%)	141 (47%)
Mialgias	135 (45%)	165 (55%)
Artralgias	130 (43,3%)	170 (56,7%)
Dores abdominais	115 (38,3%)	185 (61,7%)
Tosse	79 (26,3%)	221 (73,7%)
Corrimento nasal	49 (16,3%)	251 (83,7%)

Astenia	42 (14%)	258 (86%)
Diarreia	24 (8%)	276 (92%)
Vómitos	21 (7%)	279 (93%)
Náuseas	18 (6%)	282 (94%)
Obnubilação	16 (5,3%)	284 (94,7%)
Anorexia	13 (4,3%)	287 (95,7%)
Lesões cutâneas	6 (2%)	294 (98%)
Hemorragias	6 (2%)	294 (98%)
Diarreia com sangue	5 (1,7%)	19 (6,3%)
Dispneia	5 (1,7%)	295 (98,3%)
Dores retro-oculares	4 (1,3%)	296 (98,7%)
Convulsões	2 (0,7%)	298 (99,3%)
Diarreia com muco	1 (0,3%)	23 (7,7%)
Prurido	1 (0,3%)	299 (99,7%)
Alteração do gosto	0 (0%)	300 (100%)
Alterações visuais	0 (0%)	300 (100%)

Tabela 11: Sintomatologia registada nos doentes da amostra da província de Benguela.

A clínica álgica, nomeadamente as cefaleias (53%), as mialgias (45%), as artralgias (43,3%) e as dores abdominais (38,3%) foi a mais referida seguida da clínica respiratória, nomeadamente a tosse (26,3%) e o corrimento nasal (16,3%).

As hemorragias reportadas foram: hematúria (n=4), epistaxis (n=1) e metrorragias (n=1).

EXAME OBJECTIVO	SIM n (%)	NÃO n (%)
Palidez cutâneo-mucosa	63 (21%)	237 (79%)
Hepatomegália	21 (7%)	279 (93%)
Esplenomegália	20 (6,7%)	280 (93,3%)
Auscultação pulmonar anormal	12 (4%)	288 (96%)

Exantema	6 (2%)	294 (98%)
Sufusão conjuntival	5 (1,7%)	295 (98,3%)
Coma	1 (0,3%)	299 (99,7%)
Auscultação cardíaca anormal	1 (0,3%)	299 (99,7%)
Icterícia	0 (0%)	300 (100%)
Sinais meníngeos	0 (0%)	300 (100%)
Adenomegalias	0 (0%)	300 (100%)
Edemas	0 (0%)	300 (100%)
Choque	0 (0%)	300 (100%)

Tabela 12: Alterações no exame objectivo registadas nos doentes da amostra da província de Benguela.

As principais alterações do exame objectivo foram a palidez cutâneo-mucosa (21%) e a hepatoesplenomegália (7%). Realça-se que apenas em 68 casos existiam registos da determinação laboratorial do valor da hemoglobina e que em 59 (86,8%) se constatou a presença de anemia, tendo sido utilizada a mesma definição da fase 1.

Verificaram-se quatro casos de exantema maculopapular, sendo generalizado a todo o tegumento cutâneo em três casos e limitado aos membros inferiores num caso. Ocorreu ainda um caso de exantema vesicular nos membros superiores e tronco.

As alterações auscultatórias foram maioritariamente (n=9) a presença de ruídos adventícios (roncos, sibilos e/ou ferveores) seguido da diminuição do murmúrio vesicular (n=3) na auscultação pulmonar e a arritmia (n=1) na auscultação cardíaca.

Observou-se um caso de malária cerebral apresentando-se em coma superficial com um valor de 11 na escala de coma de Glasgow.

Os resultados dos TDR aplicados foram os seguintes:

- TDR positivo para malária: 110 (36,7%) casos, todos para *Plasmodium falciparum*;
 - Confirmação por microscopia óptica por técnicos locais em 75 casos;

Resultados

- Sem identificação por microscopia óptica em 6 casos, um dos quais referiu malária tratada no mês anterior e os restantes negaram antecedentes recentes de malária e/ou toma de antipalúdicos;
- Ausência de realização de microscopia óptica em 29 casos.
- TDR positivo para chikungunya: 55 (18,3%) casos;
- TDR positivo para dengue:
 - Ag NS1+ (n=2; 0,7%);
 - IgM+ (n=3; 1%);
 - IgG+ (n=3; 1%);
 - IgG+ / IgM+ (n=2; 0,7%);
- Verificaram-se os seguintes casos com positividades concomitantes:
 - Chikungunya / malária (n=28);
 - Dengue – IgM+ / malária (n=3);
 - Chikungunya / dengue – IgG+ (n=2);
 - Dengue – Ag NS1+ / malária (n=1).

A pesquisa de *Plasmodium* spp. por microscopia óptica foi realizada em 259 (86,3%) casos por técnicos de laboratório a nível local. Em 29,7% (n=77) dos casos avaliados o resultado foi dado como positivo, tendo sido observadas unicamente formas de *Plasmodium falciparum*. Destes, apenas em dois casos se verificou a negatividade do TDR.

Relativamente aos resultados dos ensaios de biologia molecular realizados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa enfatiza-se os seguintes aspectos:

- Foram submetidos a ensaios de biologia molecular 57 soros, 10 para dengue e 47 para chikungunya;

- A detecção de genomas virais foi levada a cabo por RT-PCR de acordo com o que foi previamente descrito por Harris et al. (1988) e Lanciotti et al. (1992) [destinada à detecção dos 4 principais serótipos do vírus dengue], ou usando *primers* que têm como alvo a sequência de encapsidação do vírus chikungunya (como descrito por Pimenta, 2013);
- O tamanho do único amplicão (produto de amplificação) obtido de forma específica foi compatível com a presença de vírus chikungunya numa das amostras.
 - Esta observação foi confirmada quer mediante a utilização de um protocolo adicional de *nested* RT-PCR usando *primers* específicos para a região UTR-3' do genoma deste vírus (Parreira R, 2017, email, 19 Abril, ricardo@ihmt.unl.pt) quer por sequenciação do produto de amplificação obtido. Este foi purificado e directamente sequenciado, tendo a análise da sequência obtida sido utilizada para pesquisar sequências homólogas em bases de dados de acesso público (*GenBank/EMBL/DDBJ*) usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, opção *MegaBlast*). A pesquisa efectuada revelou que a sequência obtida apresentava elevada semelhança com múltiplas sequências do vírus chikungunya, sendo que a maior identidade (95%) foi revelada quando comparada com a sequência da estirpe CHIKV/Homo sapiens/CMR/667/2006, com origem nos Camarões.
 - Esta amostra foi recolhida de um doente do sexo feminino, de 16 anos de idade, grávida no 2º trimestre de gestação, camponesa e residente no Chongoroi. À data de entrada no estudo referiu febre com uma duração de 14 dias acompanhada de mioartralgias e cefaleias. Ao exame objectivo apresentou uma temperatura axilar de 37,7 °C e palidez cutâneo-mucosa. Laboratorialmente destacou-se a presença de anemia (hemoglobina: 8,2 g/dl) e para além de um TDR positivo para chikungunya, teve igualmente um TDR positivo para malária (*Plasmodium falciparum*). Não foi efectuada pesquisa de *Plasmodium* spp. por microscopia óptica. Residia numa habitação tipo pau-a-pique,

não tinha rede mosquiteira e armazenava água no domicílio que provinha do rio. Negou antecedentes de malária e de febre nos últimos 3 meses, bem como história de viagens nos últimos 90 dias. Após avaliação do estudo ficou internada.

Em termos de evolução clínica constatou-se que após a inclusão do estudo ocorreu nesse mesmo dia o óbito de um doente com malária grave, o internamento em 17 (5,7%) casos e os restantes tiveram alta para o domicílio.

Os diagnósticos mais frequentes registados pela equipa clínica local foram os seguintes:

- Síndroma gripal (n=84; 28%);
- Malária (n=80; 26,7%);
- Malária + chikungunya (n=27; 9%);
- Chikungunya (n=25; 8,3%);
- Doença respiratória aguda (n=25; 8,3%);
- Parasitose intestinal (n=16; 5,3%);
- Diarreia bacteriana aguda (n=10; 3,3%);
- Outros (n=33; 11%);

3.2.2. Caracterização da amostra subdividida geograficamente entre o litoral e o interior da província

Um terço da amostra foi incluída numa região litoral e urbana (Hospital Municipal da Catumbela) e dois terços numa região interior e rural (Hospital Municipal do Chongoroi e Centro de Saúde do Senje) da província de Benguela. Assim sendo, a análise de algumas variáveis será efectuada com o intuito de se avaliar eventuais assimetrias regionais.

O predomínio do sexo feminino foi relativamente semelhante entre as duas regiões, assim como a frequência das mulheres grávidas (figuras 29 e 30).

Resultados

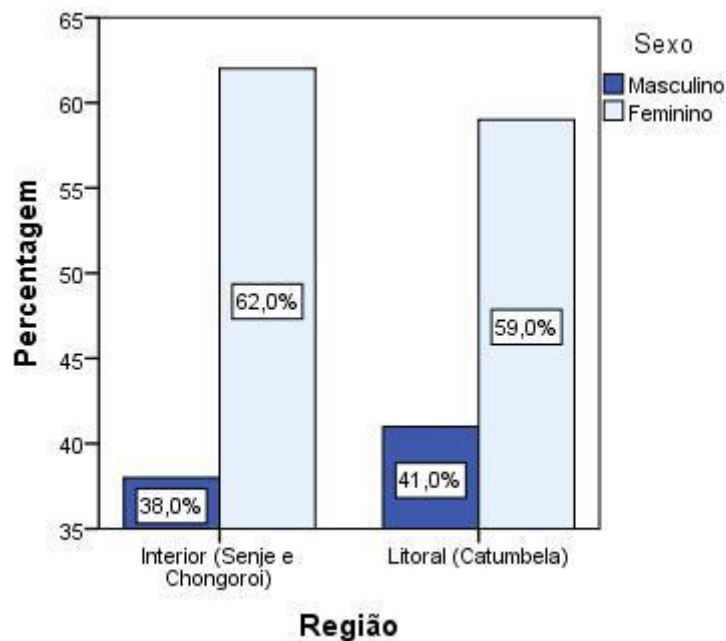


Figura 29: Distribuição por género das subamostras correspondentes ao interior e ao litoral da província de Benguela.

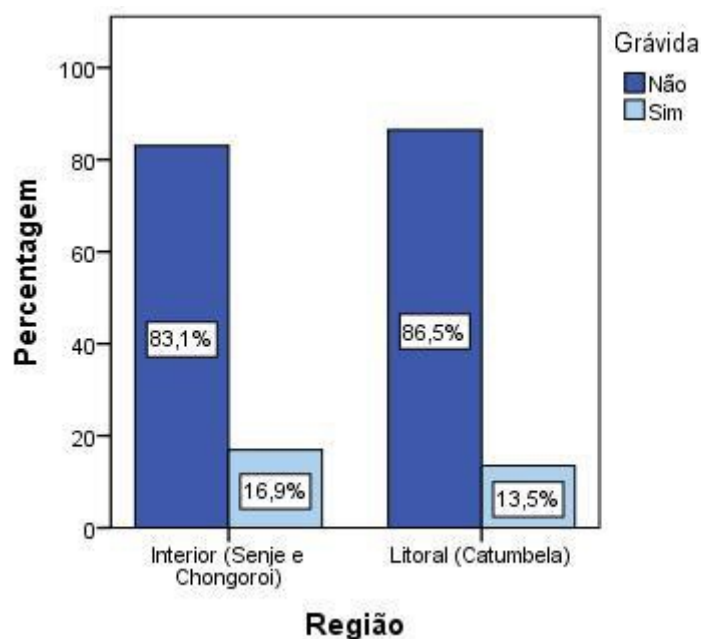


Figura 30: Distribuição do estado da gravidez dos elementos do sexo feminino na província de Benguela segundo a localização geográfica (interior/litoral).

Resultados

A idade média dos doentes incluídos na região litoral foi superior à dos doentes incluídos na região interior (21 anos *versus* 18 anos) [figuras 31 e 32].

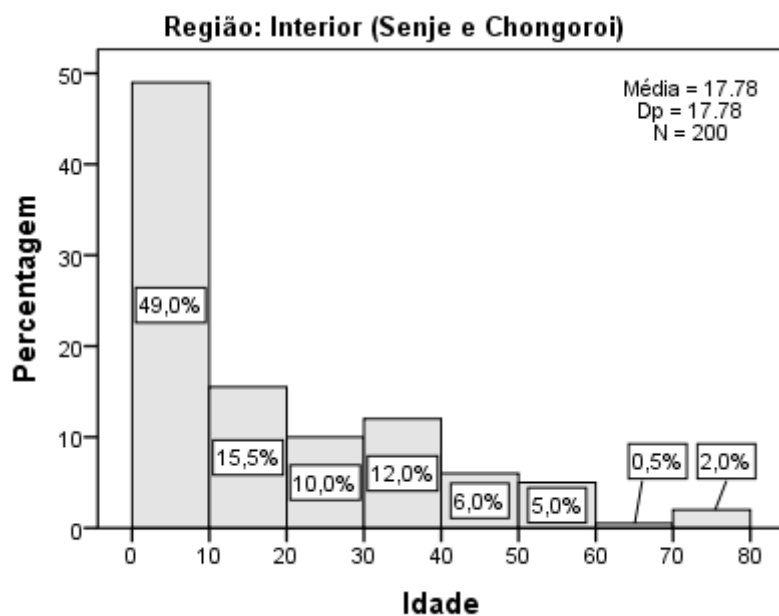


Figura 31: Distribuição etária da subamostra do interior da província de Benguela.

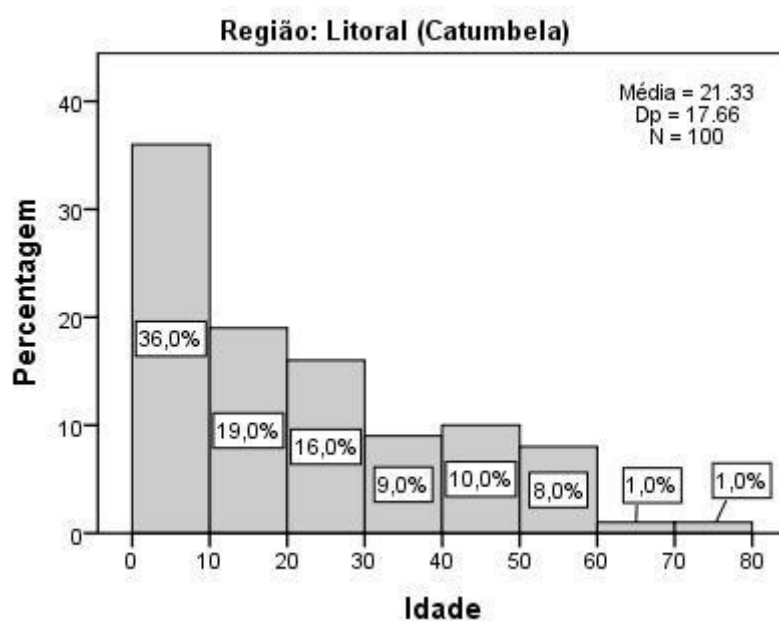


Figura 32: Distribuição etária da subamostra do litoral da província de Benguela.

Resultados

Relativamente às condições habitacionais e de actividades no ambiente doméstico e peridoméstico, destacam-se as seguintes particularidades:

- A habitação pau-a-pique foi a mais frequente na região interior e a de alvenaria com blocos cerâmicos e/ou blocos de cimento na região litoral (figura 33).

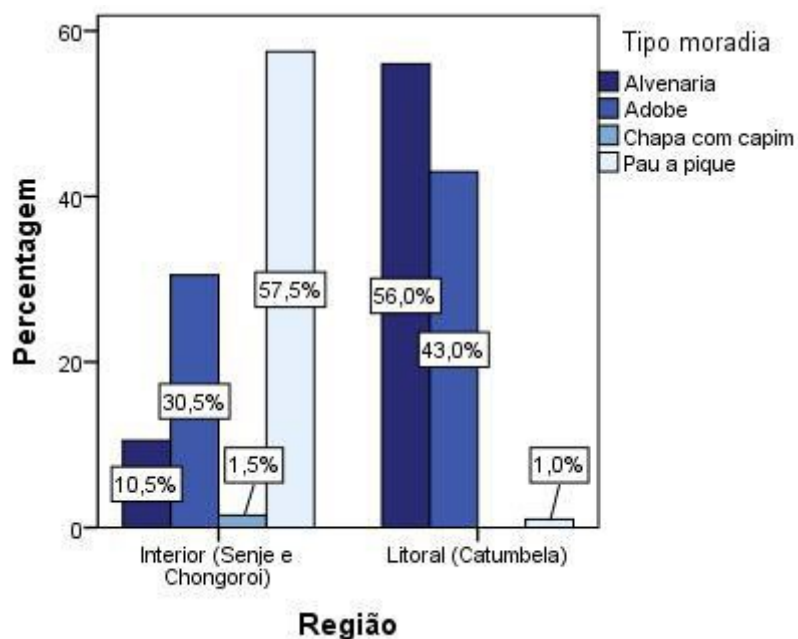


Figura 33: Distribuição do tipo de habitação na província de Benguela segundo a localização geográfica (interior/litoral).

- A maioria das habitações possuía um número de divisões igual ou inferior a 3 em ambas as regiões (figura 34).

Resultados

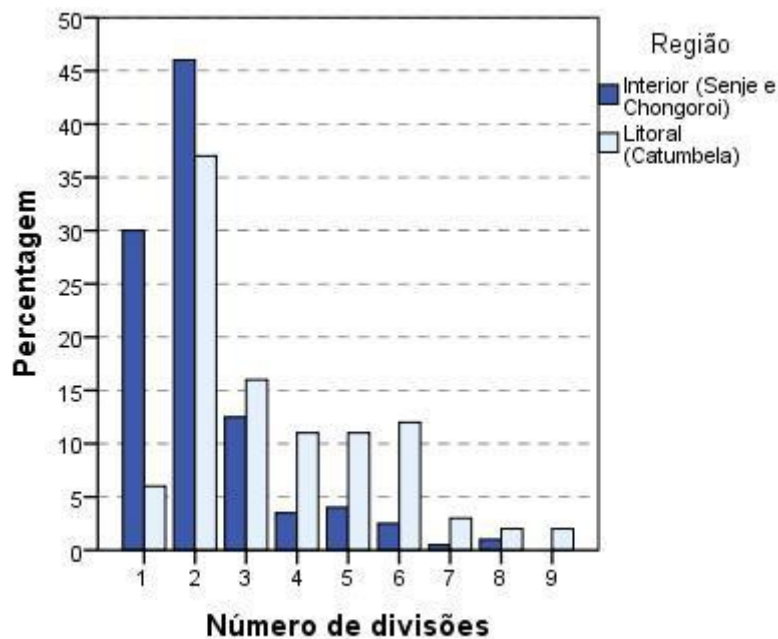


Figura 34: Distribuição do número de divisões da habitação na província de Benguela segundo a localização geográfica (interior/litoral).

- Os agregados familiares eram constituídos em média por seis elementos em ambas as regiões (figura 35).

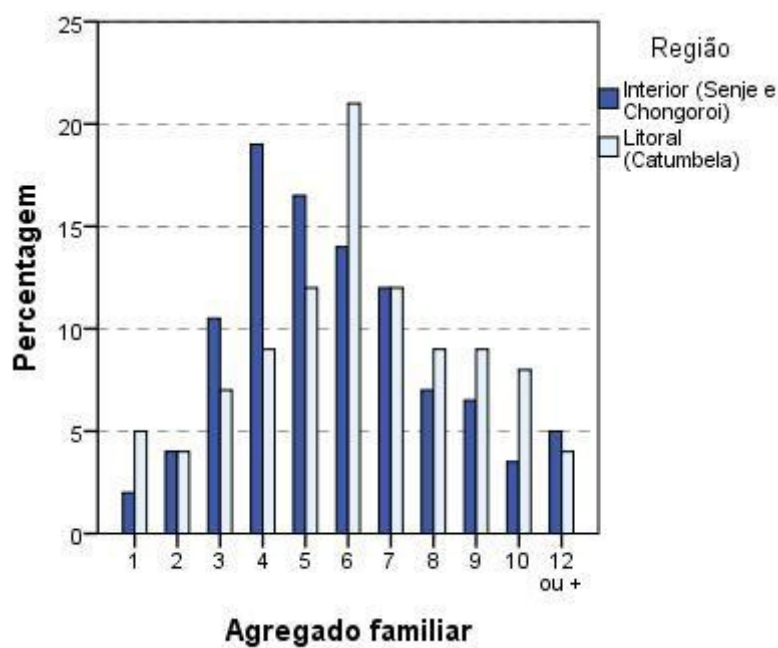


Figura 35: Distribuição do número de elementos por agregado familiar na província de Benguela segundo a localização geográfica (interior/litoral).

- A percentagem de habitações com latrina e/ou casa de banho foi de 84% (n=84) na região litoral e 28% (n=56) na região interior.
- Existia canalização de água em 59% (n=59) das habitações do litoral e em 20,5% (n=41) das habitações da região interior.
- A origem da água utilizada nos domicílios está esquematizada no figura seguinte:

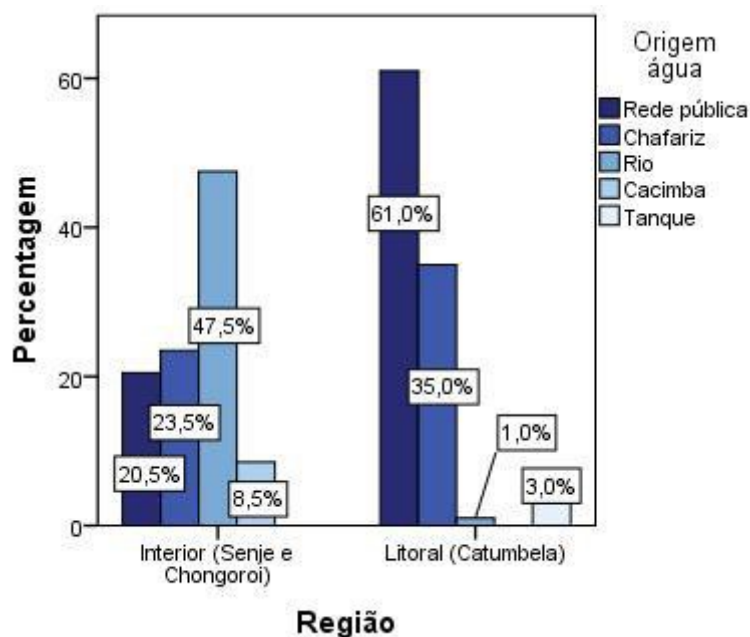


Figura 36: Origem da água utilizada nas habitações na província de Benguela segundo a distribuição geográfica (interior/litoral).

- O armazenamento de água no interior das habitações foi referido por 81% (n=162) dos doentes da região interior e por 40% (n=40) dos doentes da região litoral.

Resultados

- A posse de redes mosquiteiras no domicílio foi mencionada em 26% (n=52) dos doentes da região interior e em 39% (n=39) dos doentes da região litoral.
- A utilização de redes mosquiteiras na noite anterior à admissão no estudo foi referida por 16,5% (n=33) dos doentes da região interior e por 30% (n=30) dos doentes da região litoral.
- O contacto com animais domésticos de companhia e/ou de produção de alimentos ou de transporte foi reportado na maioria (68%; n=136) dos doentes da região interior e por 47% (n=47) dos doentes da região litoral.
- As actividades recreativas em rios foram reportadas em 65,5% (n=131) dos doentes da região interior e apenas em 1% (n=1) dos doentes da região litoral.

A ocorrência de viagens foi referida por 4% (n=4) dos doentes incluídos na região litoral, todos com viagens interprovinciais. Na região interior treze (6,5%) doentes mencionaram viagens, nove dos quais dentro da província de Benguela e quatro para a província da Huíla.

Na região interior:

- 9 (4,5%) doentes encontravam-se medicados com antibióticos e ou antiparasitários, 7 dos quais sob arteméter/lumefantrina;
- 10 (5%) mencionaram antecedentes de malária nos últimos três meses;
- 12 (6%) referiram pelo menos um episódio de febre no mesmo período temporal.

Na região litoral:

- 2 (2%) doentes estavam medicados com antibióticos e ou antiparasitários, ambos sob arteméter/lumefantrina;
- 7 (7%) doentes referiram terem tido um diagnóstico de malária nos últimos três meses;
- 8 (8%) doentes mencionaram a ocorrência de pelo menos um episódio de febre no mesmo período temporal.

Resultados

A percentagem de doentes com temperatura axilar igual ou superior a 37,5 °C foi de 32% (n=64) na região interior e de 15% (n=15) na região litoral (figuras 37 e 38).

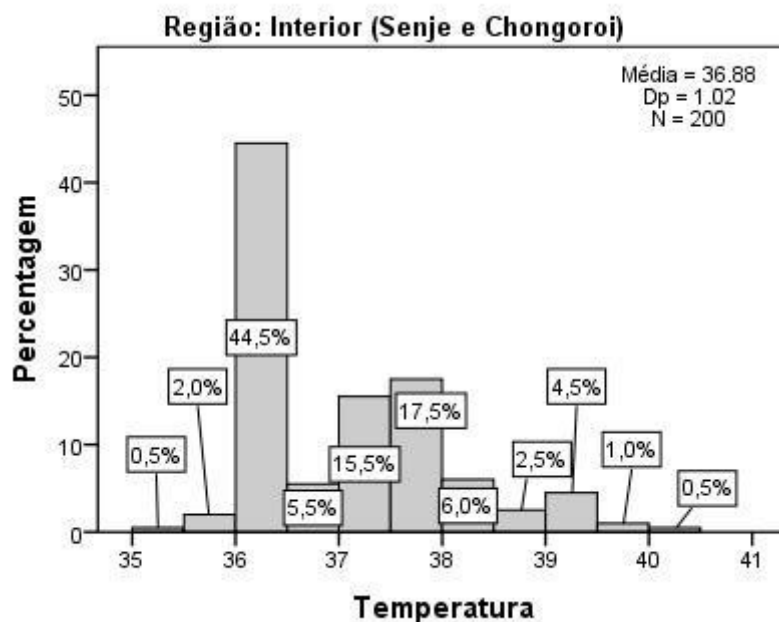


Figura 37: Temperatura corporal (°C) avaliada no momento de inclusão no estudo da subamostra do interior da província de Benguela.

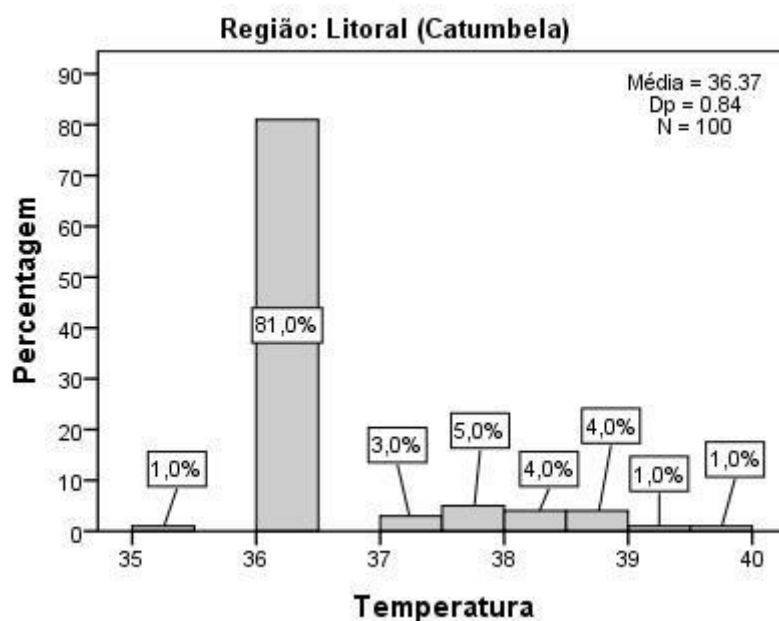


Figura 38: Temperatura corporal (°C) avaliada no momento de inclusão no estudo da subamostra do litoral da província de Benguela.

Resultados

A febre foi reportada com uma evolução média de 4,1 dias na região litoral e de 4,7 dias na região interior (figuras 39 e 40).

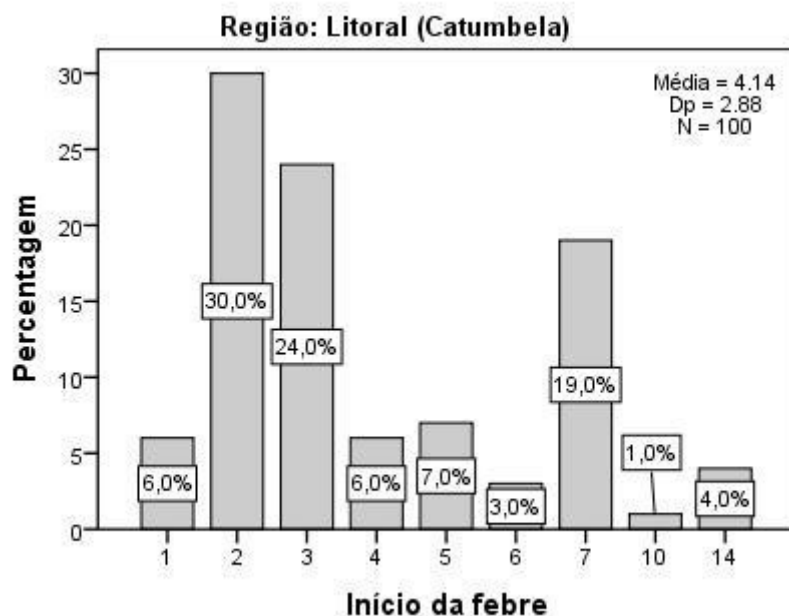


Figura 39: Distribuição segundo o início da febre (em dias) da subamostra do litoral da província de Benguela.

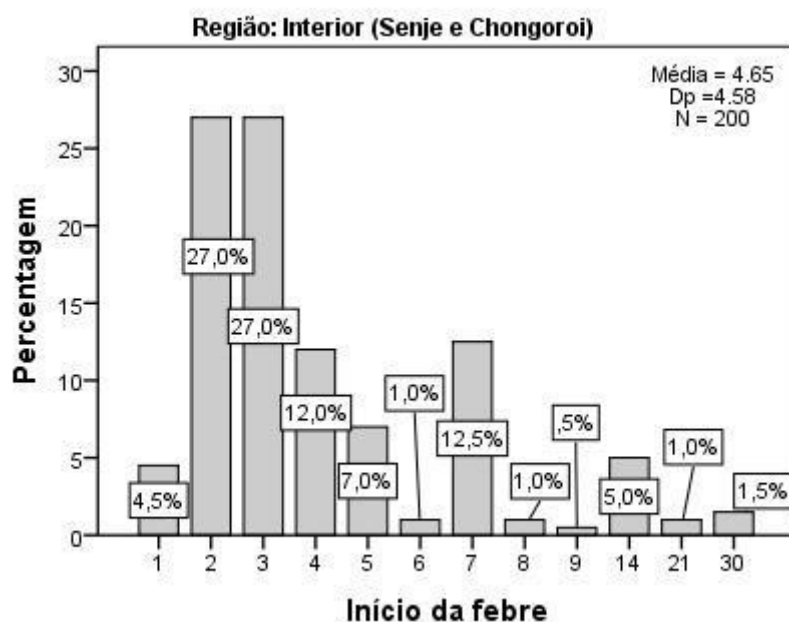


Figura 40: Distribuição segundo o início da febre (em dias) da subamostra do interior da província de Benguela.

Resultados

A sintomatologia e os achados ao exame objectivo encontram-se descritos nas tabelas subjacentes (tabelas 13 e 14).

SINTOMATOLOGIA n (%)	Interior (n=200)	Litoral (n=100)	<i>p</i>
Mialgias	80 (40%)	55 (55%)	0.019
Artralgias	75 (37,5%)	55 (55%)	0.005
Cefaleias	112 (56%)	47 (47%)	0.177
Dores retro-oculares	2 (1%)	2 (2%)	0.603
Dores abdominais	83 (41,5%)	32 (32%)	0.131
Astenia	32 (16%)	10 (10%)	0.216
Anorexia	10 (5%)	3 (3%)	0.555
Alteração do gosto	0 (0%)	0 (0%)	-----
Náuseas	13 (6,5%)	5 (5%)	0.789
Vómitos	15 (7,5%)	6 (6%)	0.811
Diarreia	16 (8%)	8 (8%)	> 0.999
Corrimento nasal	36 (18%)	13 (13%)	0.322
Dispneia	3 (1,5%)	2 (2%)	> 0.999
Tosse	55 (27,5%)	24 (24%)	0.579
Alterações visuais	0 (0%)	0 (0%)	-----
Lesões cutâneas	4 (2%)	2 (2%)	> 0.999
Prurido	1 (0,5%)	0 (0%)	> 0.999
Obnubilação	13 (6,5%)	3 (3%)	0.279
Convulsões	0 (0%)	2 (2%)	0.11
Hemorragias	5 (2.5%)	1 (1%)	0.667

Tabela 13: Sintomatologia registada nos doentes incluídos na província de Benguela segundo a distribuição geográfica.

EXAME OBJECTIVO n (%)	Interior (n=200)	Litoral (n=100)	p
Palidez cutâneo-mucosa	55 (27,5%)	8 (8%)	< 0.001
Icterícia	0 (0%)	0 (0%)	-----
Sufusão conjuntival	5 (2,5%)	0 (0%)	0.173
Exantema	4 (2%)	2 (2%)	> 0.999
Coma	0 (0%)	1 (1%)	-----
Sinais meníngeos	0 (0%)	0 (0%)	-----
Auscultação cardíaca anormal	1 (0,5%)	0 (0%)	-----
Auscultação pulmonar anormal	7 (3,5%)	5 (5%)	0.757
Hepatomegália	16 (8%)	5 (5%)	0.472
Esplenomegália	15 (7,5%)	5 (5%)	0.472
Adenomegalias	0 (0%)	0 (0%)	-----
Edemas	0 (0%)	0 (0%)	-----
Choque	0 (0%)	0 (0%)	-----

Tabela 14: Alterações no exame objectivo registadas nos doentes incluídos na província de Benguela segundo a distribuição geográfica.

Os resultados dos TDR aplicados foram os seguintes:

- TDR positivo para malária: 110 casos, todos para *Plasmodium falciparum*, 70 (35%) na região interior e 40 (40%) na região litoral;
 - Confirmação por microscopia óptica por técnicos locais em 75 casos (45 na região interior e 30 na região litoral);
 - Sem identificação por microscopia óptica em 6 casos (4 na região interior e 2 na região litoral, sendo que um destes últimos referiu malária tratada no mês anterior e todos os restantes negaram antecedentes recentes de malária e/ou toma de antipalúdicos;
 - Ausência de realização de microscopia óptica em 29 casos (21 na região interior e 8 na região litoral).

➤ TDR para chikungunya (Chik):

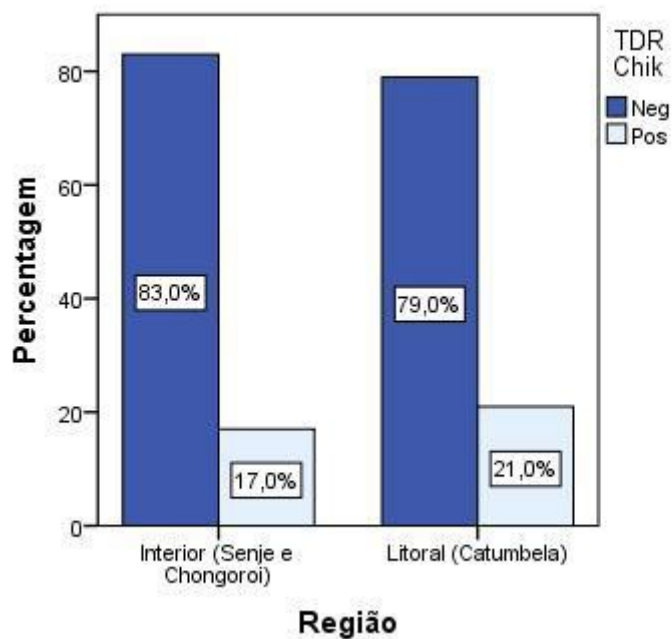


Figura 41: Resultado do TDR para chikungunya dos doentes incluídos na província de Benguela segundo a distribuição geográfica.

➤ TDR para dengue:

		Região interior	Região litoral	Total
TDR Dengue	Negativo	195	95	290
	IgG+	2	1	3
	IgG+/IgM+	0	2	2
	IgM+	1	2	3
	Ag NS1+	2	0	2
Total		200	100	300

Tabela 15: Resultado do TDR para dengue dos doentes incluídos na província de Benguela segundo a distribuição geográfica.

- Verificaram-se os seguintes casos com positividade concomitante nos diferentes TDR aplicados:
 - Chikungunya / malária (n=28):
 - 10 na região litoral e 18 na região interior;
 - Dengue – IgM+ / malária (n=3):
 - 2 na região litoral e 1 na região interior;
 - Chikungunya / dengue – IgG+ (n=2):
 - 1 em cada região;
 - Dengue – Ag NS1+ / malária (n=1):
 - 1 na região interior.

Em termos de evolução clínica constatou-se que após a inclusão do estudo ocorreu nesse mesmo dia o óbito de um doente com malária grave no Hospital Municipal do Chongoroi. Verificou-se o internamento em 17 (5,7%) casos [13 (6,5%) na região interior e 4 (4%) na região litoral] e os restantes tiveram alta para o domicílio.

3.2.3. Caracterização da subamostra com TDR positivo para malária

Na tabela seguinte apresentam-se somente as características cuja associação com TDR malária foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Para cada uma delas, as modalidades (Não/Sim, Negativa/Positiva) que correspondem a proporções significativamente diferentes nas duas subamostras (TDR malária negativo/TDR malária positivo) estão assinaladas a negrito. A tabela com caracterização da maioria das variáveis encontra-se no Anexo nº 2 (tabela C).

	Negativo (n = 190)	Positivo (n = 110)	p
Sexo			0.05
Masculino	66 (34.7%)	51(46.4%)	
Feminino	124(65.3%)	59(53.6%)	
Idade	21.135 (± 18.351)	15.22 2 (± 16.174)	0.039
Tipo de habitação			0.003
Alvenaria	60 (31.6%)	17 (15.5%)	
Adobe	66 (34.7%)	38 (34.5%)	
Pau a pique + Chapa com capim	64 (33.7%)	55(50.0%)	
Número de divisões	2.82 (±1.679)	2.35 (±1.634)	0.001
Casa de banho / Latrina			0.001
Sim	103(54.2%)	37 (33.6%)	
Não	87 (45.8%)	73(66.4%)	
Água armazenada casa			0.015
Não	72 (37.9%)	26 (23.6%)	
Sim	118(62.1%)	84(76.4%)	
Água canalizada			0.016
Sim	73 (38.4%)	27 (24.5%)	
Não	117(61.6%)	83(75.5%)	
Rede de esgoto			0.010
Sim	69 (36.3%)	24 (21.8%)	
Não	121(63.7%)	86(78.2%)	
Luz geral / gerador			0.006
Sim	83 (43.7%)	30 (27.3%)	
Não	107 (56.3%)	80 (72.7%)	
Actividades recreativas rio			0.006

Resultados

	Não	118 (62.1%)	50 (45.5%)	
	Sim	72 (37.9%)	60 (54.5%)	
Mosquiteiro última noite				0.019
	Não	142(74.7%)	95(86.4%)	
	Sim	48 (25.3%)	15 (13.6%)	
Temperatura à admissão		36.533 (±0.817)	37.02 (±1.184)	< 0.001
Palidez cutâneo-mucosa				0.005
	Não	160(84.2%)	77 (70%)	
	Sim	30 (15.8%)	33 (30%)	
Mialgias				0.002
	Não	91 (47.9%)	74(67.3%)	
	Sim	99 (52.1%)	36 (32.7%)	
Artralgias				0.005
	Não	96 (50.5%)	74(67.3%)	
	Sim	94 (49.5%)	36 (32.7%)	
Cefaleias				0.005
	Não	103(54.2%)	38 (34.5%)	
	Sim	87 (45.8%)	72(65.5%)	
Dores abdominais				0.002
	Não	130(68.4%)	55 (50%)	
	Sim	60 (31.6%)	55 (50%)	
Corrimento nasal				0.005
	Não	150(78.9%)	101(91.8%)	
	Sim	40 (21.1%)	9 (8.2%)	
Dispneia				0.006
	Não	190 (100%)	105(95.5%)	
	Sim	0 (0%)	5 (4.5%)	
Tosse				0.009

	Não	130(68.4%)	91 (82.7%)
	Sim	60 (31.6%)	19 (17.3%)
Obnubilação			0,034
	Não	184(96.8%)	100(90.9%)
	Sim	6 (3.2%)	10 (9.1%)
Hepatomegália			0.001
	Não	184(96.8%)	95 (86.4%)
	Sim	6 (3.2%)	15 (13.6%)
Esplenomegália			0.002
	Não	184(96.8%)	96 (87.3%)
	Sim	6 (3.2%)	14 (12.7%)
Microscopia óptica			< 0.001
	Negativa	176 (98.9%)	6 (7.4%)
	Positiva	2 (1.1%)	75 (92.6%)
TDR Chikungunya			0.020
	Negativo	163 (85.8%)	82 (74.5%)
	Positivo	27 (14.2%)	28 (25.5%)
Alta			0.002
	Sim	185 (97.4%)	97 (88.2%)
	Não	5 (2.6%)	13 (11.8%)

Tabela 16: Variáveis cuja associação com TDR malária foi estatisticamente significativa na amostra da província de Benguela.

Para as variáveis que se revelaram associadas com TDR malária foi realizada uma análise de regressão logística univariada com ajustamento de Firth a fim de quantificar a intensidade dessa associação (tabela 17).

Variáveis	<i>p</i>	OR	95% IC
Sexo			
Masculino / Feminino	0.047	1.624	1.006 – 2.622
Temperatura à admissão	< 0.001	1.633	1.282 – 2.08

Resultados

Palidez cutâneo-mucosa	SIM / NÃO	0.004	2.286	1.3 – 4.018
Mialgias	SIM / NÃO	0.001	0.447	0.274 – 0.73
Artralgias	SIM / NÃO	0.005	0.497	0.305 – 0.81
Cefaleias	SIM / NÃO	0.001	2.243	1.38 – 3.646
Dores abdominais	SIM / NÃO	0.002	2.167	1.337 – 3.512
Astenia	SIM / NÃO	0.056	1.899	0.984 – 3.663
Diarreia com sangue	SIM / NÃO	0.061	8	0.911 – 70.275
Corrimento nasal	SIM / NÃO	0.005	0.334	0.155 – 0.719
Dispneia	SIM / NÃO	0.002	19.863	0.826 – 477.782
Tosse	SIM / NÃO	0.007	0.452	0.253 – 0.809
Obnubilação	SIM / NÃO	0.035	3.067	1.083 – 8.685
Hepatomegália	SIM / NÃO	0.002	4.842	1.82 – 12.884
Esplenomegália	SIM / NÃO	0.003	4.472	1.666 – 12.008
Mosquiteiro na última noite	NÃO / SIM	0.019	2.141	1.134 – 4.041
Tipo de habitação		0.003		
Alvenaria / Pau a pique		0.001	0.33	0.172 – 0.633
Adobe / Pau a pique		0.144	0.67	0.391 – 1.147
Número de divisões		0.023	0.835	0.715 – 0.976
Casa de banho / Latrina	NÃO / SIM	0.001	2.336	1.434 – 3.804
Água armazenada casa	SIM / NÃO	0.012	0.507	0.299 – 0.861
Água canalizada	NÃO / SIM	0.015	1.918	1.136 – 3.237
Rede de esgoto	NÃO / SIM	0.01	2.043	1.19 – 3.508

Luz geral / Gerador	NÃO / SIM	0.005	2.069	1.244 – 3.438
Ar condicionado	NÃO / SIM	0.011	10.291	0.495 – 213.985
Actividades recreativas no rio	SIM / NÃO	0.005	1.967	1.222 – 3.166
TDR Chikungunya	Positivo / Negativo	0.017	2.061	1.141 – 3.724
Alta	NÃO / SIM	0.003	4.959	1.718 – 14.317
Internamento	SIM / NÃO	0.006	4.531	1.552 – 13.23

Tabela 17: Resultados da análise de regressão logística univariada para as variáveis cuja associação com TDR malária foi estatisticamente significativa na amostra da província de Benguela.

3.2.4. Caracterização da subamostra com TDR positivo para chikungunya

Na tabela seguinte apresentam-se somente as características cuja associação com TDR chikungunya foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Para cada uma delas, as modalidades (Não/Sim, Negativa/Positiva) que correspondem a proporções significativamente diferentes nas duas subamostras (TDR chikungunya negativo/TDR chikungunya positivo) estão assinaladas a negrito. A tabela com caracterização da maioria das variáveis encontra-se no Anexo nº 2 (tabela D).

	Negativo (n = 245)	Positivo (n = 55)	p
Idade	16.777 (± 17.026)	28.72 (± 17.979)	< 0.001
Escolaridade			0.002
Analfabeto	41 (27.3%)	19 (37.3%)	
Primária	90 (60.0%)	17 (33.3%)	
Secundária / Superior	19 (12.7%)	15 (29.4%)	
Duração da febre (dias)	4.33 (± 4.041)	5.11 (± 4.315)	0.006

Mialgias			< 0.001
	Não	151 (61.6%)	14 (25.5%)
	Sim	94 (38.4%)	41 (74.5%)
Artralgias			< 0.001
	Não	157 (64.1%)	13 (23.6%)
	Sim	88 (35.9%)	42 (76.4%)
Dores abdominais			0.014
	Não	143 (58.4%)	42 (76.4%)
	Sim	102 (41.6%)	13 (23.6%)
Corrimento nasal			0.008
	Não	198 (80.8%)	53 (96.4%)
	Sim	47 (19.2%)	2 (3.6%)
Tosse			0.017
	Não	173 (70.6%)	48 (87.3%)
	Sim	72 (29.4%)	7 (12.7%)
TDR Malária			0.020
	Negativo	163 (66.5%)	27 (49.1%)
	Positivo	82 (33.5%)	28 (50.9%)

Tabela 18: Variáveis cuja associação com TDR chikungunya foi estatisticamente significativa na amostra da província de Benguela.

Para as variáveis que se revelaram associadas com TDR chikungunya foi realizada uma análise de regressão logística univariada com ajustamento de Firth a fim de quantificar a intensidade dessa associação (tabela 19).

Variáveis	<i>p</i>	OR	95% IC
Idade	< 0.001	1.035	1.019 – 1.051
Escolaridade	0.003		
Primária / Analfabeto	0.019	0.408	0.192 – 0.864
Secundária + Superior / Analfabeto	0.229	1.704	0.715 – 4.06
Mialgias			
SIM / NÃO	< 0.001	4.704	2.434 – 9.094

Artralgias	SIM / NÃO	< 0.001	5.764	2.936 – 11.316
Dores abdominais	SIM / NÃO	0.015	0.434	0.222 – 0.85
Corrimento nasal	SIM / NÃO	0.013	0.159	0.037 – 0.676
Tosse	SIM / NÃO	0.014	0.35	0.151 – 0.811

Tabela 19: Resultados da análise de regressão logística univariada para as variáveis cuja associação com TDR chikungunya foi estatisticamente significativa na amostra da província de Benguela.

3.2.5. Caracterização da subamostra com TDR positivo para dengue

Seguidamente e apresentam-se somente as características cuja associação com TDR dengue foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Para cada uma delas, as modalidades (Não/Sim, Negativa/Positiva) que correspondem a proporções significativamente diferentes nas duas subamostras (TDR dengue negativo/TDR dengue positivo) estão assinaladas a negrito. A tabela com caracterização da maioria das variáveis encontra-se no Anexo nº 2 (tabela E).

	Negativo (n = 290)	Positivo (n = 10)	<i>p</i>
Idade	18.476 (± 17.472)	33.200 (± 21.806)	0.023
Escolaridade			0.026
Analfabeto	55 (28.6%)	5 (55.6%)	
Primária	106 (55.2%)	1 (11.1%)	
Secundária / Superior	31 (16.1%)	3 (33.3%)	
Mialgias			0.047
Não	163 (56.2%)	2 (20.0%)	
Sim	127 (43.8%)	8 (80.0%)	
Artralgias			0.003

	Não	169 (58.3%)	1 (10.0%)
	Sim	121 (41.7%)	9 (90.0%)
Astenia			0.037
	Não	252 (86.9%)	6 (60.0%)
	Sim	38 (13.1%)	4 (40.0%)

Tabela 20: Variáveis cuja associação com TDR dengue foi estatisticamente significativa na amostra da província de Benguela.

Para as variáveis que se revelaram associadas com TDR dengue foi realizada uma análise de regressão logística univariada com ajustamento de Firth a fim de quantificar a intensidade dessa associação (tabela 21).

Variáveis	<i>p</i>	OR	95% IC
Idade	0.015	1.038	1.007 – 1.07
Escolaridade	0.101		
Primária / Analfabeto	0.041	0.104	0.012 – 0.910
Secundária+Superior / Analfabeto	0.935	1.065	0.238 – 4.759
Viagens			
SIM / NÃO	0.068	4.583	0.894 – 23.494
Mialgias			
SIM / NÃO	0.041	5.134	1.072 – 24.597
Artralgias			
SIM / NÃO	0.017	12.57	1.572 – 100.53
Astenia			
SIM / NÃO	0.026	4.421	1.193 – 16.39

Tabela 21: Resultados da análise de regressão logística univariada para as variáveis cuja associação com TDR dengue foi estatisticamente significativa na amostra da província de Benguela.

3.2.6. Caracterização das subamostras com prováveis co-infecções

- ❖ Caracterização da subamostra com TDR positivo para **chikungunya** e com TDR positivo para **malária**

Esta subamostra incluiu 28 elementos, 16 (57,1%) do sexo feminino e 12 (42,9%) do sexo masculino. A idade média foi de 20,6 ($\pm 16,0$) anos, com valores extremos de 5 e de 61 anos. A maioria (64,3%; n=18) foi incluída na região interior da província de Benguela.

O tipo de habitação mais frequente foi a de pau-a-pique (n=16; 57,1%), seguido da de abobe (n=8; 28,6%) e da de alvenaria (n=4; 14,3%). A maioria (n=22; 78,6%) mencionou armazenamento de água no interior do domicílio e apenas 5 (17,9%) reportaram terem dormido na última noite debaixo de uma rede mosquiteira.

Nenhum doente reportou história de viagens.

A duração média da febre foi de 6 dias e 7 (25%) doentes apresentavam uma temperatura axilar igual ou superior a 37,5 °C aquando da entrada no estudo.

A sintomatologia e os achados ao exame objectivo encontram-se descritos nas tabelas subjacentes (tabelas 22 e 23).

SINTOMATOLOGIA	Interior (n=18) n	Litoral (n=10) n	Total (n=28) n (%)
Cefaleias	15	5	20 (71,4%)
Artralgias	8	8	16 (57,1%)
Mialgias	7	8	15 (53,6%)
Dores abdominais	8	2	10 (35,7%)
Vómitos	3	1	4 (14,3%)
Tosse	4	0	4 (14,3%)
Náuseas	3	0	3 (10,7%)
Astenia	2	0	2 (7,1%)
Anorexia	2	0	2 (7,1%)

Obnubilação	1	1	2 (7,1%)
Dispneia	1	0	1 (3,6%)
Convulsões	0	1	1 (3,6%)
Hemorragias	1	0	1 (3,6%)
Dores retro-oculares	0	0	0 (0%)
Alteração do gosto	0	0	0 (0%)
Diarreia	0	0	0 (0%)
Corrimento nasal	0	0	0 (0%)
Alterações visuais	0	0	0 (0%)
Lesões cutâneas	0	0	0 (0%)
Prurido	0	0	0 (0%)

Tabela 22: Sintomatologia registada nos doentes com TDR positivo para malária e TDR positivo para chikungunya da província de Benguela segundo a distribuição geográfica.

EXAME OBJECTIVO	Interior (n=18)	Litoral (n=10)	Total (n=28)
	n	n	n (%)
Hepatomegália	5	0	5 (17,9%)
Palidez cutâneo-mucosa	4	0	4 (14,3%)
Esplenomegália	4	0	4 (14,3%)
Auscultação pulmonar anormal	3	0	3 (10,7%)
Sufusão conjuntival	1	0	1 (3,6%)
Icterícia	0	0	0 (0%)
Exantema	0	0	0 (0%)
Coma	0	0	0 (0%)
Sinais meníngeos	0	0	0 (0%)
Auscultação cardíaca anormal	0	0	0 (0%)
Adenomegalias	0	0	0 (0%)
Edemas	0	0	0 (0%)
Choque	0	0	0 (0%)

Tabela 23: Alterações no exame objectivo registadas nos doentes com TDR positivo para malária e TDR positivo para chikungunya da província de Benguela segundo a distribuição geográfica.

A pesquisa de *Plasmodium* spp. por microscopia óptica não foi executada em 10 (35,7%) doentes e foi negativa em dois (7,1%), destacando-se que nos restantes (57,1%; n=16) foi positiva.

Encontravam-se medicados com antipalúdicos (arteméter/lumefantrina) quatro (14,3%) doentes, três dos quais tiveram uma pesquisa de *Plasmodium* spp. positiva na microscopia óptica.

Três doentes ficaram internados e os restantes tiveram alta para o domicílio.

Verificaram-se ainda como prováveis co-infecções:

❖ 4 casos de **malária e dengue**:

- 3 doentes com IgM detectável no TDR para **dengue** e com TDR positivo para **malária**;
- 1 doente com Ag NS1+ no TDR para **dengue** e com TDR positivo para **malária**.

A caracterização destes casos encontra-se sumariada nas tabelas F e G do Anexo nº 2.

3.3. Caracterização resumida de ambas as províncias

As tabelas seguintes resumem o número de TDR que foram positivos para cada patologia estudada incluindo co-infecções prováveis e apresentam algumas características clínicas da amostra global (fase 1 e fase 2).

	Província do Huambo (n=242)	Província de Benguela (n=300)	Total (n=542)
Malária	5 (2,1%)	110 (36,7%)	115 (21,2%)
Chikungunya	4 (1,7%)	55 (18,3%)	59 (10,9%)
Dengue	2 (0,8%)	10 (3,3%)	12 (2,2%)
Malária + Chikungunya	0 (0%)	28 (9,3%)	28 (5,2%)
Malária + Dengue (Ag NS1+/IgM+)	0 (0%)	4 (1,3%)	4 (0,7%)
Chikungunya + Dengue (Ag NS1+/IgM+)	1 (0,4%)	0 (0%)	1 (0,2%)

Tabela 24: Distribuição do número de TDR positivos segundo a entidade nosológica e província estudada.

	Malária n= 115	Chikungunya n= 59	Dengue n= 12	Chikungunya + Malária n= 28	Malária + Dengue (Ag NS1+ / IgM+) n=4	Chikungunya + Dengue (Ag NS1+ / IgM+) n= 1
Temperatura axilar igual ou superior a 37,5 °C à admissão	43 (37,4%)	17 (28,8%)	5 (41,7%)	7 (25%)	1 (25%)	
Mialgias	40	45	9	15	3	0

	(34,8%)	(76,3%)	(75%)	(53,6%)	(75%)	(0%)
Artralgias	77	44	11	16	3	1
	(67%)	(74,6%)	(91,7%)	(57,1%)	(75%)	(100%)
Cefaleias	73	36	8	20	3	0
	(63,5%)	(61%)	(66,7%)	(71,4%)	(75%)	(0%)
Dores abdominais	57	15	4	10	1	1
	(49,6%)	(25,4%)	(33,3%)	(35,7%)	(25%)	(100%)
Dispneia Tosse	5	1	0	1	0	0
	(4,3%)	(1,7%)	(0%)	(3,6%)	(0%)	(0%)
Obnubilação	22	9	2	4	0	0
	(19,1%)	(15,3%)	(16,7%)	(14,3%)	(0%)	(0%)
Convulsões	10	3	1	2	1	0
	(8,7%)	(5,1%)	(8,3%)	(7,1%)	(25%)	(0%)
Hemorragias	2	1	0	1	0	0
	(1,7%)	(1,7%)	(0%)	(3,6%)	(0%)	(0%)
Exantema	2	1	1	1	0	0
	(1,7%)	(1,7%)	(8,3%)	(3,6%)	(0%)	(0%)
Hepatomegalia	1	0	0	0	0	0
	(0,9%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Esplenomegalia	15	5	1	5	1	0
	(13%)	(8,5%)	(8,3%)	(17,9%)	(25%)	(0%)
	14	4	1	4	1	0
	(12,1%)	(6,8%)	(8,3%)	(14,3%)	(25%)	(0%)

Tabela 25: Caracterização clínica sumária de acordo com o total dos TDR positivos para cada entidade nosológica.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Circulação de dengue e chikungunya em território angolano

Assinalando-se as devidas ressalvas decorrentes do estudo ter sido realizado em meses, anos e províncias distintas, o que obviamente limita qualquer ilação comparativa, os resultados encontrados parecem apontar para uma manutenção da circulação de arbovírus em território angolano, em particular chikungunya e dengue que foram os vírus pesquisados. Actualmente, no ano de 2017, esta afirmação soa certamente a uma verdade de “*La Palice*” face às epidemias de dengue e de febre amarela que atingiram Angola nos anos de 2013/2014 e de 2015/2016 respectivamente. Contudo, não deve ser negligenciado o facto da primeira fase deste estudo, efectuada em 2012, ter sido pioneira na investigação recente das arboviroses em Angola, uma vez que os estudos serológicos prévios baseados em rastreios comunitários e/ou realizados em período epidémico de febre amarela datam do período colonial.

Pela primeira vez, este estudo permitiu que os TDR para chikungunya e para dengue fossem aplicados em larga escala em território angolano na avaliação de doentes com clínica suspeita de malária. Este facto deve ser enfatizado pois contribuiu para que o Departamento Nacional de Controlo de Doenças da Direcção Nacional de Saúde pública do Ministério da Saúde da República de Angola respondesse atempadamente às solicitações diagnósticas aquando do surgimento na província de Luanda dos primeiros casos da epidemia de dengue em 2013 (F. Fortes , 2015, comunicação pessoal, 18 Maio). Durante esta epidemia foram reportados, ao Ministério da Saúde, 811 TDR positivos (Ag NS1+ e/ou IgM+) para dengue (Sharp et al., 2015).

A pesquisa serológica de arboviroses conduzida em 1960 em diferentes províncias angolanas revelou uma seroprevalência de 1,6% (8/492) para chikungunya (Kokernot et al., 1965). Em período epidémico de febre amarela, no ano de 1971, a prevalência de chikungunya foi de 13,75% (81/589) na província de Luanda (Filipe e Pinto, 1973). Em 2012, a primeira fase deste estudo revelou uma seroprevalência de 1,7% (4/242). Salvaguardando-se o facto da não homogeneidade das técnicas serológicas nos estudos mencionados previamente é legítimo afirmar que a circulação do vírus chikungunya se mantém em território angolano. Este carácter de endemidade foi corroborado durante a realização da segunda fase deste trabalho, em 2015, onde a seroprevalência foi de

18,3%, tendo sido inclusivamente possível realizar tipagem molecular de um genoma viral.

No período compreendido entre as duas fases deste estudo (2012 a 2015) deve ser destacado que em Janeiro de 2014 foi diagnosticado em Portugal um caso de infecção concomitante por dengue (serotipo-4) e por chikungunya pertencente à linhagem da África Central, Oriental e Sul e que foi importado de Luanda (Parreira et al., 2014). Esta linhagem foi introduzida em Junho de 2014, no Brasil (Feira de Santana, Baía) e rapidamente se verificou uma marcada transmissão autóctone com o aparecimento de milhares de casos. Foi geneticamente considerada muito semelhante à estirpe circulante em Angola no ano de 1962 (Nunes et al., 2015; Rodrigues Faria et al., 2016). Acresce-se ainda que em Angola, após a epidemia de dengue, foram notificados 127 casos de chikungunya em 2014 e 34 casos em 2015 (Centro Nacional de Processamento de Dados Epidemiológicos, 2015).

A primeira fase deste estudo identificou ainda 2 doentes com Ag NS1+ fazendo com que a seroprevalência de dengue na região estudada fosse de 0,8%. Um dos casos também tinha um TDR positivo para chikungunya. Apesar de muito baixa, esta seroprevalência evidencia uma possível circulação deste vírus na província do Huambo em 2012. De igual forma devemos ter em mente a existência de casos esporádicos de dengue importado de Angola nas últimas quatro décadas. No entanto, a epidemia ocorrida na província de Luanda em 2013/2014 veio alterar o padrão epidemiológico desta arbovirose em território angolano uma vez que, pela primeira vez, se evidenciou a transmissão autóctone em larga escala. Foram notificados 1214 casos, sendo que 98% residiam em Luanda (Sharp et al., 2015). O serotipo-1 foi identificado como o responsável por esta epidemia e a estirpe isolada foi correspondente com a que circula na África Central e Ocidental aproximadamente há quatro décadas (Sharp et al., 2015). Contudo, em Portugal foram diagnosticados casos importados de Luanda durante o ano de 2013 com evidência de infecções maioritariamente por dengue serotipo-1, embora os outros serotipos (2, 3 e 4) tivessem sido igualmente identificados (Abreu et al., 2016; Parreira et al., 2014). Em África, a primeira documentação de circulação simultânea de

3 serotipos diferentes (1, 2 e 3) do vírus dengue ocorreu no Gabão no período de 2007 a 2010 (Caron et al., 2013).

Salienta-se ainda que quatro instituições de saúde portuguesas diagnosticaram 146 casos importados de Luanda no período de 1 de Março a 12 de Julho de 2013 (Parreira et al., 2014). Outros países (Alemanha, França, Canadá, África do Sul e Israel) também reportaram casos de dengue importados de Luanda em Abril de 2013, aquando do início da epidemia (Schwartz et al., 2013). Ficou assim estabelecida a relevância e a repercussão internacional que uma epidemia de uma arbovirose num país africano com um tráfico aéreo importante pode acarretar, sobretudo quando nesse país residem mais de 580000 estrangeiros (Instituto Nacional de Estatística, 2016).

Face ao impacto que estas epidemias tiveram na província de Luanda nos anos de 2013 e 2014, a realização de uma segunda fase deste estudo só foi logisticamente possível em 2015. Existindo conhecimento da situação epidemiológica em Luanda, a segunda fase do estudo surgiu como uma oportunidade para aumentar o conhecimento sobre estas arboviroses fora da província de Luanda.

De facto, a realização desta segunda fase na província de Benguela revelou-se muito pertinente, não só porque permitiu documentar uma seroprevalência importante para chikungunya (18,3%) e uma baixa seroprevalência para dengue (3,3%), mas também porque se verificou uma taxa relevante de positividade concomitante nos TDR para malária e chikungunya (25,45% do total dos doentes com TDR positivo para malária e 50,9% do total dos doentes com TDR positivo para chikungunya).

Em virtude da ocorrência da epidemia de dengue em Luanda em 2013/2014 e ao desconhecimento da seroprevalência nas restantes províncias optou-se por considerar a identificação isolada de IgG como um resultado positivo no TDR para dengue potencialmente compatível com uma infecção recente ou uma infecção pregressa, representando nesta última situação uma cicatriz imunológica decorrente de um contacto prévio com o vírus. No caso de uma infecção recente e secundária, a detecção de IgG pode ser muito precoce mas idealmente deve ser quantificada e repetida numa fase mais tardia para se comparem as titulações. Atendendo a que os TDR são meramente qualitativos a decisão de considerar a detectabilidade da IgG como um marcador de infecção recente pode ser discutível. Para minimizar este risco de erro

considerou-se realizar também a pesquisa por RT-PCR nestas amostras. Numa infecção secundária os anticorpos da classe IgM também poderão surgir precocemente mas com níveis seguramente inferiores aos que ocorrem numa infecção primária. Em alguns casos a IgM pode inclusive não ser detectada. A figura 42 esquematiza a cinética dos marcadores na infecção por vírus dengue. Lamentavelmente, não ocorreu a detecção molecular de genomas do vírus dengue na globalidade das amostras com TDR positivo (n=10) na província de Benguela, pelo que muito provavelmente a detecção de IgG no TDR para dengue reportou-se a uma infecção pregressa. Assim sendo, a seroprevalência em relação com uma provável infecção recente por vírus dengue foi de 2,3% (n=7) na província de Benguela e de 0,8% (n=2) na província do Huambo.

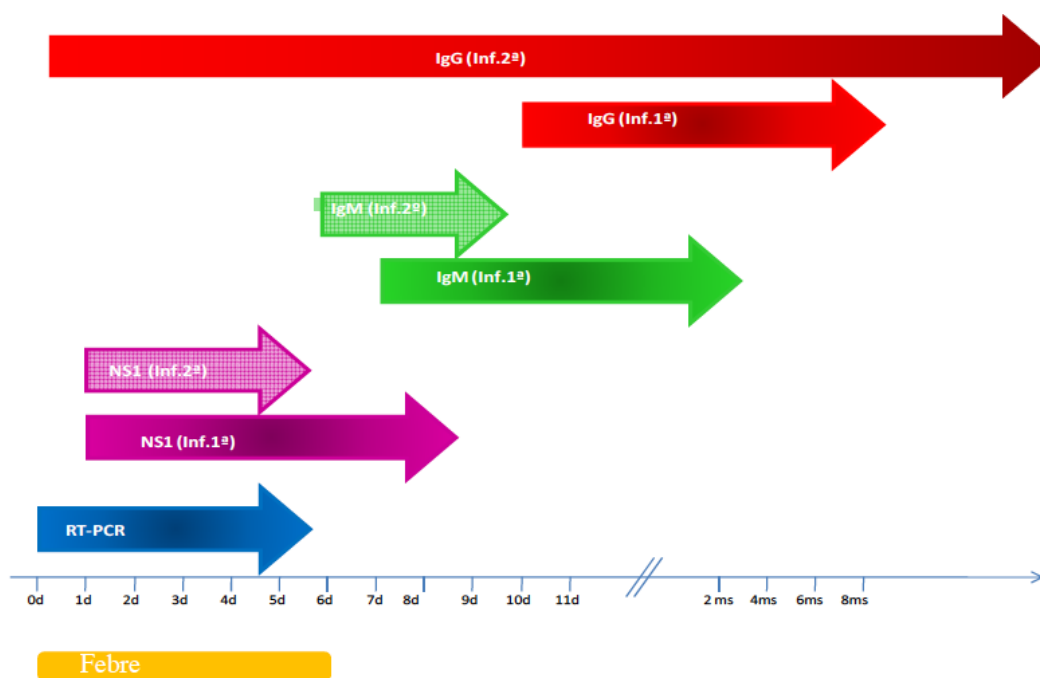


Figura 42: Cinética dos marcadores na infecção por vírus dengue¹ (Adaptado de fonte disponível em: http://amp-vaccinology.org/sites/default/files/upload/files/10-CYD-TDV_diagnosis%20strategies%20-%20v1_16Mar2017__Eng.pdf. [consultado a 2 Junho 2017].

² Abreviaturas utilizadas na figura 42: Inf: infecção; 1ª: primária; 2ª: secundária; d: dias; ms: meses

Relativamente à expressão destas arboviroses (chikungunya e dengue) noutros países africanos, particularmente num contexto não epidémico, os estudos são escassos. No entanto, salientam-se os seguintes:

- Um inquérito serológico de infecções agudas por arbovírus em 47 doentes febris com clínica suspeita de arboviroses na República da Guiné, em 2006, que revelou 11 casos de febre do Nilo Ocidental, 8 de chikungunya, 2 de febre amarela, 1 de dengue e 5 infecções por vírus Tahyna (Jentes et al., 2010);
- A avaliação de infecções agudas por chikungunya e dengue em doentes hospitalizados e com febre em hospitais do Norte da Tanzânia nos anos de 2007 e 2008 com confirmação de infecção aguda por chikungunya em 7,9% e infecção aguda presuntiva por dengue em 9,5% (Hertz et al., 2012);
- Evidência obtida no Quênia, por avaliação serológica retrospectiva em amostras colhidas no ano de 2007, de taxas de infecções pregressas por vírus dengue, vírus da febre do Vale do Rift e vírus chikungunya na ordem de 12,5%, 4,5% e 0,97% respectivamente (Ochieng et al., 2015);
- Um estudo serológico retrospectivo conduzido no Mali com amostras colhidas nos anos de 2009 a 2013 com evidência de infecção aguda por dengue (7,7%), chikungunya (5,3%) e febre do Nilo Ocidental (0,27%), entre outros agentes patogénicos (Safronetz et al., 2016);
- Evidência no Senegal, no período de 2009 a 2013, de 41 casos de infecções agudas por arbovírus (16 por chikungunya, 12 por vírus da febre amarela, 9 por Zika, 3 por dengue e 1 por vírus da febre do Vale do Rift), 48,7% dos quais com malária concomitante (Sow et al., 2016). A co-infecção chikungunya e malária foi reportada em 3 casos e a co-infecção dengue e malária num caso;
- Um rastreio serológico na população geral da Cidade do Djibouti nos anos de 2010 e 2011 revelou taxas de seroprevalência de 21,8% para dengue e de 2,6% para chikungunya (Andayi et al., 2014);
- Um rastreio serológico em dadores de sangue na Namíbia realizado em 2012 revelou uma seroprevalência de IgG+ para vírus dengue de 8% (Noden et al., 2014);

- Uma avaliação serológica de amostras recolhidas nos anos de 2012 e 2013 em Moçambique (Maputo) para pesquisar infecções recentes e progressas por vírus chikungunya e por vírus dengue, entre outros, revelou uma seroprevalência de 19,2% e de 12,8% respectivamente (Gudo et al., 2016);
- Uma avaliação de 60 doentes com febre na Nigéria (Simawa) que teve por base a utilização dos TDR, revelou uma prevalência de 11% para chikungunya, 3% para dengue e 63% para malária. A co-infecção de malária e chikungunya foi reportada em 9 casos (Ayorinde et al., 2016);

Pelo exposto, a relevância destas arboviroses objectivou-se em múltiplas regiões geográficas do continente africano, desde a África Ocidental à África Oriental e Austral.

4.2. Considerações sobre a estirpe identificada do vírus chikungunya

A sequência molecular do vírus chikungunya detectada na província de Benguela (Chongoroi) apresentou uma elevada semelhança (95%) com uma estirpe com origem nos Camarões (CHIK/Homosapiens/CMR/667/2006). Neste país, o primeiro isolamento do vírus chikungunya ocorreu, em 2006, durante uma epidemia com preponderância de síndrome febril, astenia, artralgia e exantema maculopapular em soldados franceses em Douala e em civis num centro médico urbano na capital, Yaoundé (Peyrefitte et al., 2007). Houve igualmente evidência de co-circulação do vírus dengue. A estirpe de chikungunya isolada nos Camarões era por sua vez muito semelhante à que foi isolada no ano 2000 na República Democrática do Congo (Peyrefitte et al., 2007).

É de salientar que no ano de 2007 foi reportada uma epidemia de chikungunya e dengue no Gabão, com início em Libreville e que atingiu militares franceses estacionados em bases locais e população civil e que a estirpe de chikungunya isolada revelou um elevado grau de identidade com a estirpe isolada nos Camarões no ano anterior (Peyrefitte et al., 2008). Deste modo ficou pautada a estabilidade genética destas estirpes que circulam na África Ocidental e Central desde o ano 2000.

No que concerne a estirpe isolada na República Democrática do Congo, destaca-se que foi responsável por afectar cerca de 50000 pessoas, maioritariamente em Kinshasa,

durante os anos de 1999 e 2000 e que era aparentada de estirpes previamente isoladas na República Centro-Africana e com uma estirpe isolada em 1982, no Uganda (Pastorino et al., 2004).

Isto posto, poder-se-á levantar a hipótese de a estirpe identificada no Chongoroi ter tido origem numa estirpe que circula na África Oriental, Central e Ocidental desde a década de 1980.

Reforça-se ainda, que em Maio de 2016 registou-se no Japão, um caso de chikungunya importado de Luanda e que a estirpe isolada foi idêntica a uma isolada em 1987, na República Centro-Africana (Takaya et al., 2017).

4.3. Factores populacionais potencialmente facilitadores da expansão das arboviroses em Angola

As actividades humanas podem desempenhar um papel não desprezível na cadeia de transmissão das arboviroses e são tão relevantes como a presença dos vectores e dos hospedeiros vertebrados. Deste modo procurou-se estudar algumas variáveis do enquadramento habitacional e da existência de actividades no ambiente doméstico e peridoméstico que serão abordadas seguidamente.

A população estudada em ambas as fases do estudo residia maioritariamente em zonas rurais. Salienta-se no entanto que cerca de 38,4% dos doentes incluídos na fase 1 residia no município do Huambo, o mais urbanizado da província, enquanto que na fase 2 apenas 33,7% residiam em zona urbana no litoral da província de Benguela.

Relativamente ao tipo de habitação, na província do Huambo predominou a casa com tijolo de adobe (90,5%) e na província de Benguela, a habitação pau-a-pique (38,7%) seguida da construída com tijolo de adobe (34,7%). Ambos os tipos de habitações tinham na sua larga maioria paredes desprovidas de revestimento, não dispunham de rede de esgoto, nem de água canalizada, pelo que era frequente o armazenamento de água no seu interior (85,1% na província do Huambo e 67,3% na província de Benguela). Este último factor pode contribuir para um incremento dos criadouros de *Aedes aegypti* que prefere ambientes peridomésticos. Segundo dados do Programa Nacional do Controlo da Malária baseados em inquéritos entomológicos, realizados no

período de 2010 a 2012, verificou-se a presença de *Aedes aegypti* em todas as províncias, à excepção do Moxico (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2013).

Outro factor relevante é a sobrelotação das habitações que na sua maioria possuem poucas divisões; de facto o número médio dos elementos dos agregados familiares foi de seis em ambas as províncias e a maioria dos doentes incluídos residia em habitações com um número de divisões igual ou inferior a três. Perante a presença de vectores altamente antropofílicos será entendível que uma maior densidade populacional confinada a um espaço reduzido possa acarretar um risco superior para a aquisição de arboviroses. A título meramente ilustrativo destaca-se que segundo os dados do recenseamento geral da população e da habitação de 2014, o tamanho médio do agregado familiar angolano é de 4,6 na população geral, 4,8 na população urbana e 4,4 na população rural (Instituto Nacional de Estatística, 2016).

A posse de redes mosquiteiras foi reportada em apenas 30,3% na província de Benguela e em 64,5% na província do Huambo. Este facto poderá ter contribuído para a seroprevalência da malária ter sido muito menor na província do Huambo (2,1%) quando comparada com a observada na província de Benguela (36,7%), pese embora a utilização das redes mosquiteiras não ter sido constante e diária. Acresce-se ainda que a utilização de insecticidas nas habitações foi reportada somente na província do Huambo.

Em termos de actividades peridomésticas, a lavoura, o contacto directo com animais e as actividades recreativas em rios poderão expor a população a vectores antropofílicos ou zoofílicos transmissores de arboviroses. As duas primeiras actividades foram mencionadas pela maioria da população englobada no estudo, o que não é de estranhar uma vez que são práticas comuns das populações rurais. Assim, as actividades de lavoura foram reportadas por 58,3% e por 73,3% dos doentes incluídos respectivamente nas províncias do Huambo e de Benguela e o contacto directo com animais por 59,9% e por 61% da mesma população. As actividades recreativas em rios foram mencionadas em 29,3% e em 44% da amostra incluída por esta ordem, na fase 1 e fase 2.

Na província de Benguela, ao dividir-se a amostra segundo a distribuição geográfica pode-se constatar que os aspectos mencionados previamente como potencialmente facilitadores da propagação de arboviroses assumiram uma maior expressão na região

interior e rural quando comparada com a região litoral e urbana. A sobrelotação e o número reduzido de divisões das habitações é uma realidade transversal a ambas as regiões, rural e urbana.

4.4. Considerações clínicas e laboratoriais

A primeira questão que se coloca prende-se com a utilização da noção de febre não quantificada mantida e/ou frequente como critério de inclusão. Em países de baixa e média renda a percepção de febre não é totalmente precisa pois raramente é avaliada por recurso a termómetros; inclusive algumas unidades sanitárias também não dispõem deste instrumento. A percepção materna e o toque para detectar febre sobretudo em crianças, apesar de ser uma prática comum, está longe de ser um método eficaz e preciso da avaliação da temperatura corporal. No entanto, muitos técnicos de saúde consideram que a percepção subjectiva da existência de febre é suficiente e em algumas zonas endémicas de malária não é invulgar a alta hospitalar com a prescrição de antipalúdicos e/ou antibióticos sem quantificação e confirmação do estado febril (Singh et al., 2003).

Em termos da evolução da febre, a larga maioria dos doentes incluídos no estudo reportou uma duração inferior a 21 dias, o que em termos teóricos, é totalmente enquadrável num quadro clínico de arbovirose. Apenas foram incluídos 1,6% e 1% do total das amostras do Huambo e de Benguela, respectivamente, com uma duração superior a 21 dias. O motivo de inclusão destes doentes relacionou-se com o preenchimento dos restantes critérios de inclusão, nomeadamente uma clínica compatível com malária.

A percentagem de doentes febris aquando da admissão no estudo foi de 26,3% na província de Benguela e de 31,8% na província do Huambo.

Verificou-se uma diferença entre ambas as fases no que concerne a sintomatologia mais relevante. Enquanto na província do Huambo houve um predomínio da clínica respiratória (tosse e corrimento nasal) seguida das queixas algicas, na província de Benguela ocorreu o inverso. A presença de hemorragias e/ou exantemas foi residual em ambas as fases. Por outro lado a existência de palidez cutâneo-mucosa já foi relevante (13,6% na província do Huambo e 21% na província do Huambo). A hepatomegália e a

esplenomegália com maior expressão na província de Benguela correlacionaram-se com a existência de um TDR positivo para malária.

A realização de PCR para *Plasmodium* spp. na primeira fase do estudo demonstrou uma óptima performance do TDR utilizado, uma vez que dos 5 doentes com um TDR positivo para malária, apenas um teve um resultado negativo por PCR. Por outro lado, dos 42 doentes que tiveram relatada uma pesquisa de *Plasmodium* spp. como positiva por microscopia óptima, somente 4 tiveram confirmação por PCR (todos com um TDR positivo). Pelo exposto, a realização de PCR para o diagnóstico de malária foi considerada como redundante, razão pela qual não foi contemplada na segunda fase do estudo.

O registo de malária clínica sem confirmação laboratorial e/ou de malária com uma gota espessa negativa, apesar de não ter sido evidenciado nos doentes incluídos neste estudo, uma vez que em todos os casos de malária com TDR negativo existiu uma referência a uma microscopia positiva, era uma prática comum das equipas clínicas locais como se pode constatar na figura 16. Acresce-se ainda que numa expressiva maioria dos casos relatados como tendo uma microscopia positiva não ocorreu a confirmação por métodos de biologia molecular (PCR), situação que merece uma reflexão sobre as práticas e a experiência laboratorial a nível local. Deste modo, na província do Huambo ficou bem patente que os prescritores locais não decidem em função do resultado do TDR para a malária.

No que diz respeito ao verificado na província de Benguela, dos 77 casos relatados como tendo uma pesquisa positiva de *Plasmodium* spp. por microscopia óptica, apenas dois tiveram um TDR negativo. Recorde-se que em ambas as fases foi aplicado o mesmo TDR.

A incerteza que floresce reside na anuência e na actuação em conformidade com o resultado do TDR para malária por parte dos prescritores locais, especialmente em épocas de baixa prevalência de malária. Nestas circunstâncias, perante uma clínica compatível com malária e um resultado negativo do TDR, os prescritores locais colocam frequentemente esse resultado em causa. Contudo, não devemos negligenciar a falta de recursos e de técnicas laboratoriais para o diagnóstico diferencial, que poderão ser inexistentes nesses locais de trabalho.

A taxa de positividade por RT-PCR para dengue e para chikungunya foi muito baixa (0% para dengue e 2,1% para chikungunya) na província de Benguela e foi nula na província do Huambo. Como factores pré-analíticos eventualmente contributivos para este facto devem ser mencionados as dificuldades na manutenção da cadeia de frio e no transporte das amostras. Apesar das amostras terem sido conservadas a uma temperatura de -20 °C, as dificuldades de um fornecimento contínuo de energia eléctrica (rede pública e/ou gerador a gásóleo) foram uma realidade podendo eventualmente ter existido 1 ou 2 ciclos de descongelação incompleta durante as fases de conservação e de transporte das amostras. Outro factor a considerar deve ser a fase da doença em que a colheita da amostra foi realizada, nomeadamente se fora do período de virémia.

No que diz respeito à utilização do TDR para chikungunya, continua por clarificar a sua aplicabilidade clínica embora existam dois estudos que apontam para uma baixa performance do TDR utilizado neste estudo, referindo uma sensibilidade de 30% e de 50,8% e uma especificidade de 73% e de 89,2% (Prat et al., 2014; Kosasih et al., 2012). Estes resultados são contraditórios com os mencionados no folheto informativo do TDR *SD BIOLINE® Chikungunya IgM*, que reporta uma sensibilidade de 97,1% e uma especificidade de 98,9% (Standard Diagnostics, 2008). No entanto, refira-se que o TDR para chikungunya utilizado neste trabalho não foi usado com o intuito de avaliar a sua performance mas sim como a única ferramenta diagnóstica disponível nas condições do terreno mesmo com as suas limitações.

4.5. Identificação de factores de risco

Os factores de risco potencialmente relevantes para a aquisição de dengue e de chikungunya evidenciaram-se através da análise estatística efectuada, particularmente na fase 2, na província de Benguela, uma vez que na fase 1 o número de subamostras com TDR positivo para dengue e para chikungunya foi muito reduzido, o que condiciona a validade da sua análise estatística.

Para os dados obtidos na fase 2, de seguida descrevem-se algumas das variáveis que mostraram, com significância estatística (p inferior ou igual a 0,005), constituir factores de risco (determinado pelo cálculo de “odds ratio”) para as infecções por chikungunya, dengue e *Plasmodium* spp.

Na subamostra com TDR positivo (n=55) para chikungunya da Fase 2 destacaram-se como factores de risco as seguintes variáveis:

- Idade
 - Por cada aumento de um ano na idade as chances de ter um TDR positivo para chikungunya aumentam 1,035 vezes (x);
- Escolaridade
 - As chances de ter um TDR positivo para os indivíduos que têm ensino primário são 0,408x menores que nos indivíduos iletrados;
- Mialgias
 - As chances de uma pessoa com mialgias ter um TDR positivo são 4,704x maiores do que nas que não têm mialgias;
- Artralgias
 - As chances de uma pessoa com artralgias ter um TDR positivo são 5,764x maiores do que nas que não têm artralgias;
- Dores abdominais, corrimento nasal e tosse
 - As chances de ter um TDR positivo para os indivíduos que têm dores abdominais e/ou corrimento nasal e/ ou tosse são respectivamente 0,434x, 0,159x e 0,35x menores que as chances dos indivíduos que não têm essa mesma sintomatologia.

Com as devidas cautelas decorrentes da reduzida dimensão da subamostra com TDR positivo (n=10) para dengue na Fase 2 destacaram-se:

- Idade
 - Por cada aumento de um ano na idade as chances de ter um TDR positivo para dengue aumentam 1,038x;

- Escolaridade
 - As chances de ter um TDR positivo para os indivíduos que têm ensino primário são 0,104x menores que as chances dos indivíduos iletrados;
- Mialgias
 - As chances de uma pessoa com mialgias ter um TDR positivo são 5,134 vezes maiores do que aqueles que não têm mialgias;
- Artralgias
 - As chances de uma pessoa com artralgias ter um TDR positivo são 12,57 vezes maiores do que aqueles que não têm artralgias;
- Astenia
 - As chances de ter um TDR positivo para os indivíduos que têm astenia são 4,421x maiores do que aqueles que não têm astenia.

Em relação aos factores de risco para malária com TDR positivo (n=110), evidenciaram-se os seguintes:

- Sexo masculino (OR: 1,624);
- O tipo de habitação (as chances de ter um TDR positivo para os indivíduos que habitam em casa de alvenaria são 0,33x menores que as chances dos indivíduos que residem em habitações de pau-a-pique);
- A não utilização do mosquiteiro (OR: 2,141);
- O número de divisões (quando o número de divisões aumenta 1 unidade as chances de ter TDR malária positivo são 0,835x menores);
- A inexistência de casa de banho/latrina (OR: 2,336);
- A inexistência de electricidade (OR: 2,069);
- A inexistência de água canalizada (OR: 1,918);
- A inexistência de rede de esgoto (OR: 2,043);
- As actividades recreativas no rio (OR: 1,967);

- Temperatura à admissão (OR: 1,633);
- Palidez cutâneo-mucosa (OR: 2,286);
- Cefaleias (OR: 2,243);
- Dores abdominais (OR: 2,167);
- Obnubilação (OR: 3,067);
- Dispneia (OR: 19,863);
- Hepatomegália (OR: 4,842);
- Esplenomegália (OR: 4,472);
- TDR positivo para chikungunya (OR: 2,061);
- Internamento (OR: 4,531).

Reitera-se que em amostras de dimensão reduzida (com um número inferior a 30) para confirmar os resultados obtidos em termos estatísticos será necessário dispor de uma amostra mais alargada.

Por outro lado, os factores de risco identificados são consistentes com as características clínicas e epidemiológicas de cada patologia, sugerindo uma aquisição de dados e análise estatística correctas.

Realça-se ainda que o OR referente à dispneia foi bastante alto decorrente do facto de a todos os doentes dispneicos (n=5) ter sido diagnosticado malária com critérios de gravidade.

4.6. Identificação de prováveis co-infecções

Este estudo demonstrou que uma percentagem não desprezível (25,5%; n=28) do total de casos de malária, também tinha uma provável co-infecção por vírus chikungunya. Registaram-se ainda 4 casos com malária e dengue (3 com IgM+ e 1 com AgNS1+).

Estes dados são importantes, uma vez que até 2015 não existiram relatos destas co-infecções em Angola. As cefaleias, artralgias e mialgias foram as queixas

sintomatológicas mais referidas. As alterações mais frequentes ao exame objectivo foram a hepatoesplenomegália e a palidez cutâneo-mucosa.

Recentemente, noutros países africanos como o Senegal e a Nigéria documentaram-se co-infecções malária/chikungunya (Sow et al., 2016; Ayorinde et al., 2016).

Relembre-se ainda que em 2014 foi reportado um caso importado de Angola de co-infecção por dengue e por chikungunya.

Não se registaram casos de co-infecções triplas por dengue, chikungunya e malária neste estudo. No entanto, destaca-se que um caso desta co-infecção tripla foi publicado recentemente, em 2016, na Índia. A detecção ocorreu num estudo serológico realizado nos anos de 2011 e 2012 (Hati et al., 2016).

As implicações em termos de Saúde Pública destas co-infecções deverão ser objecto de análise e de estudo.

4.7. Limitações do estudo

Este estudo apresenta limitações e fragilidades, nomeadamente em diferentes áreas de actuação, que serão abordadas seguidamente:

- Deve existir alguma ponderação na interpretação dos resultados estatísticos em subamostras de dimensão reduzida, particularmente se inferiores a 30 elementos; Deste modo as conclusões mais valorizáveis deverão ser as referentes à subamostra com TDR positivo para malária (n=110) e à subamostra com TDR positivo para chikungunya (n=55) na província de Benguela;
- No que concerne o diagnóstico laboratorial de dengue por técnicas de biologia molecular, não foi utilizada a RT-PCR em tempo real, técnica recomendada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos da América. Contudo, a técnica utilizada (RT-PCR convencional) está bem sustentada na literatura médica. Idealmente, deveriam ser utilizadas ambas as técnicas;
- O diagnóstico laboratorial de chikungunya por TDR necessita de uma maior validação, uma vez que os estudos clínicos da sua aplicabilidade são escassos. Portanto, ainda se preconiza a realização de técnicas como a cultura viral, a RT-

PCR, a detecção de IgM e IgG por ELISA ou imunofluorescência indirecta e os testes de neutralização pela redução de placas. A especificidade destas técnicas vai depender da altura da colheita relativamente ao início da sintomatologia.

4.8. Recomendação de estratégias de acção e/ou identificação de áreas relevantes para futuras pesquisas

Em virtude dos resultados obtidos neste estudo, sugerem-se as seguintes estratégias de acção e recomendações:

- **Implementar um programa nacional de vigilância clínica, serológica e entomológica para as arboviroses**, uma vez que ficou patente a circulação de arbovírus. Também dever-se-á ter em consideração o risco de propagação internacional, quer pela presença e/ou disseminação de vectores compatíveis, quer pela mobilidade de hospedeiros virémicos;
- **Realizar estudos de seroprevalência das arboviroses em diferentes épocas do ano noutras províncias e com amostras de grandes dimensões**, de forma a identificar variações regionais que tenham implicações nas estratégias de combate e também com o intuito de uma avaliação socioeconómica da carga destas doenças na globalidade do território angolano;
- **Alterar as condições habitacionais, promover a educação e combater a pobreza de maneira a propiciar condições de menor propagação das arboviroses e da malária**;
- **Criar condições técnicas para o processamento de amostras biológicas por técnicas de biologia molecular num laboratório de referência nacional em Luanda**, com o objectivo de se minimizar as dificuldades logísticas para a conservação das amostras e que são inerentes ao transporte internacional das mesmas;
- **Avaliar a necessidade de introdução da vacina contra o dengue**. Apesar de ter sido constatada uma baixa prevalência de dengue neste estudo, a epidemia de 2013/2014 revelou a endemicidade desta doença com potencial epidémico, pelo que se sugere a realização de estudos para averiguar a necessidade de

introdução da vacina actualmente disponível [Dengvaxia® (CYD-TDV), Sanofi Pasteur, Lião, França]. Esta vacina tetravalente viva atenuada foi introduzida pela primeira vez no México, em Dezembro de 2015, e está recomendada para a população dos países endémicos para dengue com idade compreendida entre os 9 e os 45 anos. É administrada em 3 doses, aos 0, 6 e 12 meses. Os estudos de aprovação demonstraram uma redução das infecções por dengue em dois terços dos participantes e uma redução do número de hospitalizações (8 em 10), bem como uma redução quantificada em 93% do número dos casos graves (Hadinegoro et al., 2015);

- **Manutenção da cobertura vacinal para a febre amarela** para minimizar quer o risco de ressurgimento de outra epidemia como a que cursou em 2015/2016, quer o potencial de co-circulação de outros arbovírus em fase epidémica de febre amarela;
- Atendendo a percentagens relevantes de síndrome gripal como diagnósticos de alta, cerca de 26,9% na província do Huambo e de 28% na província de Benguela, seria interessante **promover um estudo de avaliação da prevalência de vírus respiratórios em doentes com clínica suspeita de malária**. A racionalização do uso empírico de antibióticos nas infecções respiratórias poderá ser uma necessidade;
- **Promover a cooperação em estudos sobre arboviroses a nível internacional, p. ex. com os países que integram a região dos grandes lagos africanos e a comunidade de desenvolvimento da África Austral**. Em alguns destes países, como a Tanzânia, existem dados da avaliação de causas de febre em crianças não hospitalizadas que revelam as seguintes prevalências: 11,9% de infecções víricas nasofaríngeas, 10,5% de malária, 10,3% de gastroenterite, 5,9% de infecções do tracto urinário, 3,7% de febre tifóide, 1,5% de infecções da pele e mucosas, 0,2% de meningites e 3,2% de causas indeterminadas, mas que não incluíram a pesquisa de arbovírus (D'Acremont et al., 2014).
- Por último, **realizar um fluxograma de avaliação e diagnóstico da síndrome febril suspeita de malária** para ser aplicado nas unidades locais de prestação de cuidados de saúde, tendo em consideração os dados deste e de outros estudos

realizados em Angola, bem como as recomendações vigentes da Organização Mundial de Saúde sobre este tópico. É pertinente e imperioso que se regulamentem as indicações para antibioterapia, p. ex. para a pneumonia e para a disenteria; assim como que se proceda em conformidade com o resultado do TDR para malária, quer referente à prescrição de combinações derivadas das artemisininas, quer em termos de investigação etiológica subsequente. Este estudo revelou p. ex. como preditores de infecção por chikungunya as mialgias e as artralguas e como preditores para malária as cefaleias e a hepatoesplenomegália. Deste modo, seria interessante a introdução e validação destas características clínicas num fluxograma de avaliação.

4.9. Considerações finais com referência a outros arbovírus em circulação em Angola

Tendo em consideração os resultados deste estudo realizado em 2012 e em 2015 e que incidiu sobre dengue e chikungunya, bem como a evidência de outros arbovírus em circulação em Angola nos últimos anos, a temática das arboviroses continuará pertinente, actual e será certamente meritória de trabalhos mais aprofundados.

A relevância das arboviroses em Angola tem sido crescente, sobretudo após as epidemias de dengue em 2013/2014, de chikungunya em 2014 e de febre amarela em 2015/2016. Esta última epidemia evidenciou a endemidade do país para a febre amarela, uma vez que a estirpe identificada foi filogeneticamente idêntica à responsável pela epidemia de 1971, em Luanda (Grobbelaar et al., 2016). No período de Dezembro de 2015 na província de Luanda, iniciou-se uma epidemia que durou até Dezembro de 2016 e que se propagou por todas as províncias angolanas e também para a República Democrática do Congo. Registaram-se 4347 casos suspeitos com 377 óbitos (taxa de mortalidade de 8,7%) e foram confirmados laboratorialmente 884 casos, dos quais 121 faleceram (taxa de mortalidade de 13,7%) (*World Health Organization*, 2016). Para além da República Democrática do Congo, também foram exportados casos para o Quênia e para a República Popular da China, documentando-se desta maneira o risco de propagação internacional através de viajantes não vacinados. O potencial de introdução do vírus febre amarela na Ásia, onde existe *Aedes aegypti*, foi amplamente debatido

fruto da importação destes casos para a República Popular da China (Wasserman et al., 2016).

Ainda durante o decurso da epidemia de febre amarela em Angola foi reportado um caso de febre do Vale do Rift, em Julho de 2016, na República Popular da China, num trabalhador da construção de estradas, de nacionalidade chinesa e proveniente de uma região a 22 km a leste de Luanda (Liu et al., 2016).

Mais recentemente foi reportado o primeiro caso de transmissão autóctone do vírus da encefalite japonesa em África, nomeadamente em Angola. Este diagnóstico foi concomitante com o de febre amarela num doente que adoeceu em Março de 2016 e que não tinha antecedentes de viagens para o estrangeiro (Simon-Lorieri et al., 2017). Certamente que os viajantes intercontinentais quando virémicos representam uma janela de oportunidade para a disseminação dos arbovírus em países com vectores compatíveis.

Para finalizar, apenas uns breves comentários respeitantes aos objectivos deste estudo. O objectivo geral foi atingido especialmente através da identificação molecular de uma estirpe de chikungunya e relativamente aos objectivos específicos foi possível uma boa caracterização clínica e epidemiológica, uma identificação de factores de risco através de análise estatística (mais robusta para as infecções por vírus chikungunya) e a caracterização de prováveis co-infecções. No entanto, reitera-se a necessidade de uma amostra mais alargada no caso das subamostras de TDR positivo para dengue e no caso das co-infecções.

Poder-se-á ambicionar a integração dos factores preditivos obtidos neste estudo para as infecções por vírus chikungunya e para malária em algoritmos de diagnóstico diferencial da malária em Angola. A validação subsequente deste algoritmo permitiria melhorar o fornecimento de antipalúdicos, minimizando deste modo, o aparecimento de eventuais efeitos secundários deletérios e desnecessários decorrentes de uma prescrição não recomendada, bem como a emergência de resistências medicamentosas. Adicionalmente, poderia promover uma melhor gestão dos antimaláricos distribuídos no sistema público com impacto económico considerável.

Existem métodos de diagnóstico laboratorial, p. ex. o TDR para chikungunya e a pesquisa, a nível local, de *Plasmodium* spp. por microscopia óptica que carecem de uma

melhor validação. Seria interessante a realização de um estudo com o objectivo de averiguar a performance do TDR utilizado para chikungunya se possível com uma comparação com outros TDR disponíveis no mercado e com outras técnicas de diagnóstico laboratorial para este vírus. Refira-se ainda que a realização das técnicas de biologia molecular para dengue e chikungunya foram dificultadas por eventuais constrangimentos na conservação e transporte das amostras, pelo que a realização destes procedimentos em Angola seria uma mais-valia. Por outro lado, o TDR para malária utilizado obteve uma performance adequada na avaliação realizada na província do Huambo.

A realização da segunda fase deste projecto foi sendo sucessivamente adiada, reflectindo a fragilidade do sistema de saúde angolano para lidar com situações de emergência face ao ressurgimento de epidemias por arbovírus. Uma minimização do impacto das arboviroses só poderá ser obtida pela existência de programas eficientes de vigilância.

Será inevitável a (re-)emergência de outros arbovírus em Angola? Que conhecimento actualizado dispomos p. ex. do vírus Zika, do vírus o'nyong-nyong e do vírus do Nilo Ocidental em Angola?

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, C., Silva-Pinto, A., Lazzara, D., Sobrinho-Simões, J., Guimarães, J. T. & Sarmiento, A. 2016, Imported dengue from 2013 Angola outbreak: Not just serotype 1 was detected. *J Clin Virol*, 79:77-9.
- Alirol, E., Getaz, L., Stoll, B., Chappuis, F. & Loutan, L. 2011, Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. *Lancet Infect Dis*, 11(2):131-41.
- Amarasinghe, A., Kuritsk, J. N., Letson, G. W. & Margolis, H. S. 2011, Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis*, 17(8):1349-54.
- Andayi, F., Charrel, R. N., Kieffer, A., Richet, H., Pastorino, B., Leparc-Goffart, I., Ahmed, A. A., Carrat, F., Flahault, A. & de Lamballerie, X. 2014, A sero-epidemiological study of arboviral fevers in Djibouti, Horn of Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(12):e3299.
- Ayorinde, A. F., Oyeyiga, A. M., Nosegbe, N. O. & Folarin, O. A. 2016, A survey of malaria and some arboviral infections among suspected febrile patients visiting a health centre in Simawa, Ogun State, Nigeria. *J Infect Public Health*, 9(1):52-9.
- Bakker, R. C., Veenstra, J., Dingemans-Dumas, A. M., Wetsteyn, J. C. F. M. & Kager, P. A. 1996, Imported Dengue in The Netherlands. *J Travel Med*, 3(4):204-8.
- Blacksell, S. D. 2012, Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: recent evaluations and future needs?. *J Biomed Biotechnol*, 2012:151967.
- Blacksell, S. D., Jarman, R. G., Bailey, M.S., Tanganuchitcharnchai, A., Jenjaroen, K., Gibbons, R. V., Paris, D. H., Premaratna, R., de Silva, H. J., Lalloo, D. G. & Day, N. P. 2011, Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. *Clin Vaccine Immunol*, 18(12):2095-101.
- Burt, F. J., Rolph, M. S., Rulli, N. E., Mahalingam, S., & Heise, M. T. 2012, Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet*, 379(9816):662-71.

Cambournac, F. J., Gandara, A. F., Pena, A. J. & Teixeira W. L. 1955, [Research on yellow fever in Angola]. *An Inst Med Trop (Lisb)*, 12(1-2):101-20. [artigo em Português]

Carnevale, P., Toto, J. C., Besnard, P., Santos, M. A., Fortes, F., Allan, R. & Manguin, S. 2015, Spatio-temporal variations of *Anopheles coluzzii* and *An. gambiae* and their *Plasmodium* infectivity rates in Lobito, Angola. *J Vector Ecol*, 40(1):172-9.

Caron, M., Grard, G., Paupy, C., Mombo, I. M., Bikie Bi Nso, B., Kassa Kassa, F. R., Nkoghe, D. & Leroy, E. M. 2013, First evidence of simultaneous circulation of three different dengue virus serotypes in Africa. *PLoS One*, 8(10):e78030.

Caron, M., Paupy, C., Grard, G., Becquart, P., Mombo, I., Nso, B. B., Kassa Kassa, F., Nkoghe, D. & Leroy, E. M. 2012, Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa. *Clin Infect Dis*, 55(6):e45-53.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013, Ongoing dengue epidemic - Angola, June 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 62(24):504-7.

Centro Nacional de Processamento de Dados Epidemiológicos, 2015. *Boletim epidemiológico* 2015. Disponível em: www.minsa.gov.ao/download.aspx?id=1556&tipo=publicacao [Consultado a 2 Junho 2017].

Chai, L. Y., Lim, P. L., Lee, C. C., Hsu, L. Y., Teoh, Y. L., Lye, D. C., Krishnan, P. & Leo, Y. S. 2007, Cluster of *Staphylococcus aureus* and dengue co-infection in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*, 36(10):847-50.

Charrel, R. N., Abboud, M., Durand, J. P., Brouqui, P. & De Lamballerie, X. 2003, Dual infection by dengue virus and *Shigella sonnei* in patient returning from India. *Emerg Infect Dis*, 9(2):271.

Charrel, R. N., Brouqui, P., Foucault, C. & de Lamballerie, X. 2005, Concurrent dengue and malaria. *Emerg Infect Dis*, 11(7):1153-4.

Cheng, Q., Gatton, M. L., Barnwell, J., Chiodini, P., McCarthy, J., Bell, D. & Cunningham, J. 2014, Plasmodium falciparum parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malar J*, 13:283.

Cosep Consultoria, Consaúde e ICF Macro 2011, *Inquérito de Indicadores de Malária em Angola de 2011*. Calverton, Maryland: Cosep Consultoria, Consaúde e ICF Macro e ICF Macro.

D'Acremont, V., Kilowoko, M., Kyungu, E., Philipina, S., Sangu, W., Kahama-Maró, J., Lengeler, C., Cherpillod, P., Kaiser, L. & Genton, B. 2014, Beyond malaria--causes of fever in outpatient Tanzanian children. *N Engl J Med*, 370(9):809-17.

D'Acremont, V., Lengeler, C. & Genton, B. 2010, Reduction in the proportion of fevers associated with Plasmodium falciparum parasitaemia in Africa: a systematic review. *Malar J*, 22;9:240.

Dinko, B., Oguike, M. C., Larbi, J. A., Bousema, T. & Sutherland, C. J. 2013, Persistent detection of Plasmodium falciparum, P. malariae, P. ovale curtisi and P. ovale wallikeri after ACT treatment of asymptomatic Ghanaian school-children. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 3:45-50.

Dircio Montes Sergio, A., González Figueroa, E., María Saadia, V. G., Elizabeth, S. H., Beatriz, R. S., Altuzar Aguilar Víctor, M. & Navarrete Espinosa, J. 2012, Leptospirosis prevalence in patients with initial diagnosis of dengue. *J Trop Med*, 2012:519701.

Dupuis-Maguiraga, L., Noret, M., Brun, S., Le Grand, R., Gras, G. & Roques, P. 2012, Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(3):e1446.

Epelboin, L., Hanf, M., Dussart, P., Ouar-Epelboin, S., Djossou, F., Nacher, M. & Carme, B. 2012, Is dengue and malaria co-infection more severe than single infections? A retrospective matched-pair study in French Guiana. *Malar J*, 11:142.

- Filipe, A. F. & Pinto, M. R. 1973, Arbovirus studies in Luanda, Angola. 2. Virological and serological studies during an outbreak of dengue-like disease caused by the Chikungunya virus. *Bull World Health Organ*, 49(1):37-40.
- Franco, L., Di Caro, A., Carletti, F., Vapalahti, O., Renaudat, C., Zeller, H. & Tenorio, A. 2010, Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. *Euro Surveill*, 15(7). pii: 19490.
- Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajcar, D., Lesnikar, V., Klobučar, A., Pem-Novosel, I., Kurečić-Filipović, S., Komparak, S., Martić, R., Duričić, S., Betica-Radić, L., Okmadžić, J., Vilibić-Čavlek, T., Babić-Erceg, A., Turković, B., Avsić-Županc, T., Radić, I., Ljubić, M., Sarac, K., Benić, N. & Mlinarić-Galinović, G. 2011, Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill*, 16(9). pii: 19805.
- Gotuzzo, E., Yactayo, S. & Córdova, E. 2013, Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hyg*, 89(3):434-44.
- Gould, E. A. & Solomon, T. 2008, Pathogenic flaviviruses. *Lancet*, 371(9611):500-9.
- Gratz, N. G. 2004, Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*, 18(3):215-27.
- Grobbelaar, A. A., Weyer, J., Moolla, N., Jansen van Vuren, P., Moises F. & Paweska, J. T. 2016, Resurgence of Yellow Fever in Angola, 2015-2016. *Emerg Infect Dis*, 22(10):1854-5.
- Gubler, D. J. 2004, The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5):319-30.
- Gudo, E. S., Lesko, B., Vene, S., Lagerqvist, N., Candido, S. I., Razão de Deus, N., Pinto, F. D., Pinto, G., Monteiro, V., Evaristo, V. L., Bhatt, N., Manhica, I. & Falk, K. I. 2016, Seroepidemiologic Screening for Zoonotic Viral Infections, Maputo, Mozambique. *Emerg Infect Dis*, 22(5):915-7.

Hadinegoro, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., Muhammad Ismail, H. I., Reynales, H., Limkittikul, K., Rivera-Medina, D. M., Tran, H. N., Bouckennooghe, A., Chansinghakul, D., Cortés, M., Fanouillere, K., Forrat, R., Frago, C., Gailhardou, S., Jackson, N., Noriega, F., Plennevaux, E., Wartel, T. A., Zambrano, B. & Saville, M.; CYD-TDV Dengue Vaccine Working Group. 2015, Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med*, 373(13):1195-206.

Harris, E., Roberts, T. G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L. D., Valle, S., Sandoval, E. & Balmaseda, A. 1998, Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 36(9):2634-39.

Hati, A. K., Bhattacharjee, I., Mukherjee, H., Bandyopadhyay, B., Bandyopadhyay, D., De, R. & Chandra, G. 2012, Concurrent dengue and malaria in an area in Kolkata. *Asian Pac J Trop Med*, 5(4):315-7.

Hati, A. K., Chandra, G., Mukherjee, H., Mondal, R., Talukdar, S. & Bhattacharyya, N. 2016, Concurrent infections of three mosquito borne diseases-dengue, chikungunya and malaria. *Journal of Mosquito Research*, 6(8): 1-3.

Henchal, E. A. & Putnak, J. R. 1990, The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*, 3(4):376-96.

Hertz, J. T., Munishi, O. M. Ooi, E. E., Howe, S., Lim, W. Y., Chow, A., Morrissey, A. B., Bartlett, J. A., Onyango, J. J., Maro, V. P., Kinabo, G. D., Saganda, W., Gubler, D. J. & Crump, J. A. 2012, Chikungunya and dengue fever among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*, 86(1):171-7.

Instituto Nacional de Estatística 2016, *Resultados Definitivos do Recenseamento Geral da População e Habitação de Angola 2014* . Instituto Nacional de Estatística, Luanda, Angola.

Jentes, E. S., Robinson, J., Johnson, B. W., Conde, I., Sakouvogui, Y., Iverson, J., Beecher, S., Bah, M. A., Diakite, F., Coulibaly, M., Bausch, D. G. & Bryan, J. 2010,

Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006. *Am J Trop Med Hyg*, 83(2):388-94.

Kelvin, A. A. 2011, Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *J Infect Dev Ctries*, 5(6):441-4.

Kokernot, R. H., Casaca, V. M., Weinbren, M.P. & McIntosh, B. M. 1965, Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of indigenous residents of Angola. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 59(5):563-70.

Kosasih, H., Widjaja, S., Surya, E., Hadiwijaya, S. H., Butarbutar, D. P., Jaya, U. A., Nurhayati Alisjahbana, B. & Williams, M. 2012, Evaluation of two IgM rapid immunochromatographic tests during circulation of Asian lineage Chikungunya virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 43(1):55-61.

Kyabayinze, D. J., Asiimwe, C., Nakanjako, D., Nabakooza, J., Counihan, H. & Tibenderana, J. K. 2010, Use of RDTs to improve malaria diagnosis and fever case management at primary health care facilities in Uganda. *Malar J*, 9:200.

La Ruche, G., Souarès, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., Lenglet, A., Jourdain, F., Leparc-Goffart, I., Charlet, F., Ollier, L., Mantey, K., Mollet, T., Fournier, J. P., Torrents, R., Leitmeyer, K., Hilairat, P., Zeller, H., Van Bortel, W., Dejour-Salamanca, D., Grandadam, M. & Gastellu-Etchegorry, M. 2010, First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill*, 15(39):19676.

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., Vorndam, A. V. 1992, Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30(3):545-51.

Lee, I. K., Liu, J. W. & Yang, K. D. 2005, Clinical characteristics and risk factors for concurrent bacteremia in adults with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 72(2):221-6.

- Lepiniec, L., Dalgarno, L., Huong, V. T., Monath, T. P., Digoutte, J. P. & Deubel, V. 1994, Geographic distribution and evolution of yellow fever viroses based on direct sequencing of genomic Cdna fragments. *J Gen Virol*, 75 (Pt 2): 417-23.
- Liu, W., Sun, F. J., Tong, Y. G., Zhang, S. Q. & Cao, W. C. 2016, Rift Valley fever virus imported into China from Angola. *Lancet Infect Dis*, 16(11):1226.
- Lopez Rodriguez, E., Tomashek, K. M., Gregory, C. J., Munoz, J., Hunsperger, E., Lorenzi, O. D., Irizarry, J. G. & Garcia-Gubern, C. 2010, Co-infection with dengue virus and pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis*, 16(5):882-4.
- Luchavez, J., Baker, J., Alcantara, S., Belizario, V. Jr., Cheng, Q., McCarthy, J. S. & Bell, D. 2011, Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malar J.*, 10:286.
- Macedo, R. N., Rocha, F. A., Rolim, D. B., Vilar, D. C., Araújo, F. M., Vieira, N. N., Teixeira, J. R., Carvalho, M. C., Oliveira, F. G. & Cavalcanti, L. P. 2012, Severe coinfection of melioidosis and dengue fever in Northeastern Brazil: first case report. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45(1):132-3.
- Manimunda, S. P, Vijayachari, P., Uppoor, R., Sugunan, A. P., Singh, S. S., Rai, S. K., Sudeep, A. B., Muruganandam, N., Chaitanya, I. K. & Guruprasad, D. R. 2010, Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104(6):392-9.
- Muyembe-Tamfum, J. J., Peyrefitte, C. N., Yogoelo, R., Mathina Basisya, E., Koyange, D., Pukuta, E., Mashako, M., Tolou, H. & Durand, J. P. 2003, [Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 200 in the Democratic Republic of the Congo]. *Med Trop (Mars)*, 63(6):637-8. [artigo em Francês]
- Nações Unidas 2010, *Relatório sobre os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio 2010*. Instituto de Estudos para o Desenvolvimento, Mem Martins.

Nações Unidas 2015, *Relatório sobre os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio 2015*. Organização das Nações Unidas.

Nimmannitya, S. 2009, “Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever”, in *Manson's Tropical Diseases* (pp. 753-61), ed. G. C. Cook & A. I. Zumla, Saunders Elsevier, China.

Nimmannitya, S., Halstead, S. B., Cohen, S. N. & Margiotta, M. R. 1969, Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 18(6):954-71.

Noden, B. H., Musuuu, M., Aku-Akai, L., van der Colf, B., Chipare, I. & Wilkinson, R. 2014, Risk assessment of flavivirus transmission in Namibia. *Acta Trop*, 137:123-9.

Nunes, M. R., Faria, N. R., de Vasconcelos, J. M., Golding, N., Kraemer, M. U., de Oliveira, L. F., Azevedo, R. do S., da Silva, D. E., da Silva, E. V., da Silva, S. P., Carvalho, V. L., Coelho, G. E., Cruz, A. C., Rodrigues, S. G., Vianez, J. L. Jr., Nunes, B. T., Cardoso, J. F., Tesh, R. B., Hay, S. I., Pybus, O. G. & Vasconcelos, P. F. 2015, Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 2015 Apr 30;13:102.

Ochieng, C., Ahenda, P., Vittor, A. Y., Nyoka, R., Gikunju, S., Wachira, C., Waiboci, L., Umuro, M., Kim, A. A., Nderitu, L., Juma, B., Montgomery, J. M., Breiman, R. F. & Fields, B. 2015, Seroprevalence of Infections with Dengue, Rift Valley Fever and Chikungunya Viruses in Kenya, 2007. *PLoS One*, 10(7):e0132645.

Parreira, R., Centeno-Lima, S., Lopes, A., Portugal-Calisto, D., Constantino, A. & Nina, J. 2014, Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. *Euro Surveill*, 19(10). pii: 20730.

Parreira, R., Conceição, C., Centeno-Lima, S., Marques, N., Saraiva da Cunha, J., Abreu, C., Sá, L., Sarmiento, A., Atouguia, J., Moneti, V., Azevedo, T., Nina, J., Mansinho, K., Antunes, A., Teodósio, R., Nazareth, T. & Seixas, J. 2014, Angola's 2013 dengue outbreak: clinical, laboratory and molecular analyses of cases from four Portuguese institutions. *J Infect Dev Ctries*, 8(9):1210-5.

- Pastorino, B., Muyembe-Tamfum, J. J., Bessaud, M., Tock, F., Tolou, H., Durand, J.P. & Peyrefitte, C.N. 2004, Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *J Med Virol*, 74(2):277-82.
- Peyrefitte, C. N., Bessaud, M., Pastorino, B. A., Gravier, P., Plumet, S., Merle, O. L., Moltini, I., Coppin, E., Tock, F., Daries, W., Ollivier, L., Pages, F., Martin, R., Boniface, F., Tolou, H. J. & Grandadam, M. 2008, Circulation of Chikungunya virus in Gabon, 2006-2007. *J Med Virol*, 80(3):430-3.
- Peyrefitte, C. N., Rousset, D., Pastorino, B. A., Pouillot, R., Bessaud, M., Tock, F., Mansaray, H., Merle, O. L., Pascual, A. M., Paupy, C., Vessiere, A., Imbert, P., Tchendjou, P., Durand, J. P., Tolou, H. J. & Grandadam, M. 2007, Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerg Infect Dis*, 13(5):768-71.
- Pialoux, G., Gaüzère, B. A., Jauréguiberry, S. & Strobel, M. 2007, Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis*, 7(5):319-27.
- Pimenta, A. 2013, “Identificação da sequência de encapsidação do genoma do vírus Chikungunya (CHIKV)”. [Identification of the chikungunya vírus (CHIKV) genome packaging sequence] [Master’s dissertation]. Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; Portuguese.
- Pinto, M. R. & Filipe, A. R. 1973, Arbovirus studies in Luanda, Angola. 1. Virological and serological studies during a yellow fever epidemic. *Bull World Health Organ*, 49(1):31-5.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H. & Weaver, S. C. 2001, Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol*, 75(21):10118-31.
- Prat, C. M., Flusin, O., Panella, A., Tenebray, B., Lanciotti, R. & Leparç-Goffart, I. 2014, Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus. *Emerg Infect Dis*, 20(12):2129-32.

Programa Nacional de Controlo da Malária 2010, *Plano Nacional de Monitoria e Avaliação 2011 – 2015*. 1^{iro} Draft. Luanda: Ministério da Saúde.

Ratsitorahina, M., Harisoa, J., Ratovonjato, J., Biacabe, S., Reynes, J. M., Zellert, H., Raoelina, Y., Talarmin, A., Richard, V. & Louis Soares, J. 2008, Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis*, 14:1135–7.

Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M. G., Majori, G. C. & Cassone, A.; CHIKV study group. 2007, Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*, 370(9602):1840-6.

Ribeiro, H. 1973, Entomological studies during the 1971 yellow fever epidemic of Luanda, Angola. *Mosquito News*, 33(4):568-72.

Ribeiro, H. 1973, The control of *Aedes aegypti* during the yellow fever epidemic in Luanda, Angola, in 1971. *Bull World Health Organ*, 48(4):504-5.

Robillard, P. Y., Boumahni, B., Gérardin, P., Michault, A., Fourmaintraux, A., Schuffenecker, I., Carbonnier, M., Djémili, S., Choker, G., Roge-Wolter, M. & Barau, G. 2006, [Vertical maternal fetal transmission of the chikungunya virus. Ten cases among 84 pregnant women]. *Presse Med*, 35(5 Pt 1):785-8. [artigo em Francês]

Robinson, M. C. 1955, An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 49(1):28-32.

Rodrigues Faria, N., Lourenço, J., Marques de Cerqueira, E., Maia de Lima, M., Pybus, O. & Carlos Junior Alcantara, L. 2016, Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. *PLoS Curr*, 8. pii: ecurrents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2.

Rosen, L., Shroyer, D. A., Tesh, R.B., Freier, J. E. & Lien, J. C. 1983, Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 32(5):1108-19.

Ross, R. W. 1956, The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)*, 54(2):177-91.

Rowe, A. K., de León, G. F., Mihigo, J., Santelli, A. C., Miller, N. P. & Van-Dúnem, P. 2009, Quality of malaria case management at outpatient health facilities in Angola. *Malar J*, ;8:275.

Safronetz, D., Sacko, M., Sogoba, N., Rosenke, K., Martellaro, C., Traoré, S., Cissé, I., Maiga, O., Boisen, M., Nelson, D., Oottamasathien, D., Millett, M., Garry, R. F., Branco, L. M., Doumbia, S., Feldmann, H. & Traoré, M. S. 2016, Vectorborne Infections, Mali. *Emerg Infect Dis*, 22(2):340-2.

Schwartz, E., Meltzer, E., Mendelson, M., Tooke, A., Steiner, F., Gautret, P., Friedrich-Jaenicke, B., Libman, M., Bin, H., Wilder-Smith, A., Gubler, D. J., Freedman, D. O. & Parola, P. 2013, Detection on four continents of dengue fever cases related to an ongoing outbreak in Luanda, Angola, March to May 2013. *Euro Surveill*, 18(21). pii: 20488.

Sharp, T. M., Moreira, R., Soares, M. J., Miguel da Costa, L., Mann, J., DeLorey, M., Hunsperger, E., Muñoz-Jordán, J. L., Colón, C., Margolis, H. S., de Carvalho, A. & Tomashek, KM. 2015, Underrecognition of Dengue during 2013 Epidemic in Luanda, Angola. *Emerg Infect Dis*, 21(8):1311-6.

Shillcutt, S., Morel, C., Goodman, C., Coleman, P., Bell, D., Whitty, C. J. & Mills, A. 2008, Cost-effectiveness of malaria diagnostic methods in sub-Saharan Africa in an era of combination therapy. *Bull World Health Organ*, 86(2):101-10.

Simizu, B., Yamamoto, K., Hashimoto, K. & Ogata, T. 1984, Structural proteins of Chikungunya virus. *J Virol*, 51(1):254-8.

Simon-Loriere, E., Faye, O., Prot, M., Casademont, I., Fall, G., Fernandez-Garcia, M. D., Diagne, M. M., Kipela, J. M., Fall, I. S., Holmes, E. C., Sakuntabhai, A. & Sall, A. A. 2017, Autochthonous Japanese Encephalitis with Yellow Fever Coinfection in Africa. *N Engl J Med*, 376(15):1483-1485.

Singh, M., Pai, M. & Kalantri, S. P. 2003, Accuracy of perception and touch for detecting fever in adults: a hospital-based study from a rural, tertiary hospital in Central India. *Trop Med Int Health*, 8(5):408-14.

Smith, D. W., Hall, R. A., Johansen, C. A., Broom, A. K. & Mackenzie, J. S. 2009, “Arbovirus Infections”, in *Manson`s Tropical Diseases* (pp. 715-51), ed. G. C. Cook & A. I. Zumla, Saunders Elsevier, China.

Snounou, G., Viriyakosol, S. Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V. E., Thaithong, S. & Brown, K. N. 1993, High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 61(2):315-20.

Sousa Galito, M. 2015, *Emigração Portuguesa em Angola*. CI-CPRI, AI, N.º 22, Junho, pp. 1- 14.

Sousa, C. A., Clairouin, M., Seixas, G., Viveiros, B., Novo, M. T., Silva, A. C., Escoval, M. T. & Economopoulou, A. 2012, Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. *Euro Surveill*, 17(49). pii: 20333.

Sow, A., Loucoubar, C., Diallo, D., Faye, O., Ndiaye, Y., Senghor, C. S., Dia, A. T., Faye, O., Weaver, S. C., Diallo, M., Malvy, D. & Sall, A. A. 2016, Concurrent malaria and arbovirus infections in Kedougou, southeastern Senegal. *Malar J*, 15:47.

Standard Diagnostics, 2008. SD BIOLINE® Chikungunya IgM. Folheto informativo do teste, Coreia do Sul.

Standard Diagnostics, 2010. SD BIOLINE® Dengue Duo, Dengue NS1 + Ab Combo. Folheto informativo do teste, Coreia do Sul.

Standard Diagnostics, 2011. SD BIOLINE® Malaria Antigen P.f/P.v. Folheto informativo do teste, Coreia do Sul.

Sudjana, P. & Jusuf, H. 1998, Concurrent dengue hemorrhagic fever and typhoid fever infection in adult: case report. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 29(2):370-2.

Takaya, S., Kutsuna, S., Nakayama, E., Taniguchi, S., Tajima, S., Katanami, Y., Yamamoto, K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kato, Y., Kanagawa, S. & Ohmagari, N. 2017, Chikungunya Fever in Traveler from Angola to Japan, 2016. *Emerg Infect Dis*, 23(1):156-158.

Taraphdar, D., Sarkar, A., Mukhopadhyay, B. B. & Chatterjee, S. 2012, A comparative study of clinical features between monotypic and dual infection cases with Chikungunya virus and dengue virus in West Bengal, India. *Am J Trop Med Hyg* , 86(4):720-3.

Teles, F. R. 2011, Update of dengue in Africa. *Dengue Bulletin*. - V.35, p. 35-51.

Theiler, M. & Smith, H. H. 1973, The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med*, 65(6):787-800.

Thwing, J. I., Mihigo, J., Fernandes, A. P., Saute, F., Ferreira, C., Fortes, F., de Oliveira, A. M. & Newman, R. D. 2009. How much malaria occurs in urban Luanda, Angola? A health facility-based assessment. *Am J Trop Med Hyg*, (3):487-91.

Tsetsarkin K. A., Chen, R., Leal, G., Forrester, N., Higgs, S., Huang, J. & Weaver, S. C. 2011, Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(19): 7872-7.

United Nations 2011. *International Human Development Indicators. Country Profiles*. Disponível em: <http://hdrstats.undp.org/en/countries/profiles/AGO.html> [Consultado a 3 Março 2017].

Vainio, J. & Cutts, F. 1998, *Yellow fever*. WHO/EPI/GEN/9811 World Health Organization, Geneva.

Vasconcelos, P. F., Travassos da Rosa, E. S., Travassos da Rosa, J. F., de Freitas, R. B., Dégallier, N., Rodrigues, S. G. & Travassos da Rosa, A. P. 1993, [Outbreak of classical

fever of dengue caused by serotype 2 in Araguaiana, Tocantins, Brazil]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 35(2):141-8. [artigo em Português]

Ward, D. I. 2006, A case of fatal *Plasmodium falciparum* malaria complicated by acute dengue fever in East Timor. *Am J Trop Med Hyg*, 75(1):182-5.

Wasserman, S., Tambyah, P. A. & Lim, P. L. 2016, Yellow fever cases in Asia: primed for an epidemic. *Int J Infect Dis*, 48:98-103.

Weaver, S. C. & Reisen, W. K. 2010, Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*, 85(2):328-45.

Wilson, M. L. 2012, Malaria rapid diagnostic tests. *Clin Infect Dis.*, 54(11):1637-41.

Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A. & Wernsdorfer, W.H. 2007, A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg*, 77(6 Suppl):119-27.

World Health Organization 1967, Arboviruses and Human Disease – Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 369, 1-84.

World Health Organization 2009, *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition*. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization 2016, *Situation report Yellow Fever 28 October 2016*.

Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250661/yellowfeversitrept28Oct16-eng.pdf;jsessionid=CA533CC36AD60F1213E76CB167BF99A8?sequence=1>

[Consultado a 7 Março 2017].

Zaki, S. A. & Lad, V. 2011, Concurrent infection of dengue fever and hepatitis A infection: A case report. *Indian J Crit Care Med*, 15(4):238-40.

6. ANEXOS

6.1. Anexo n.º 1



**REPÚBLICA DE ANGOLA
MINISTÉRIO DA SAÚDE
DIRECÇÃO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO NACIONAL DE CONTROLO DE DOENÇAS**

DECLARAÇÃO

Para os efeitos achados convenientes, declara-se que o Dr. Nuno Miguel da Silva Marques integra a equipa da Direcção Nacional de Saúde Pública constituída para a realização do estudo integrado de “ Diagnóstico Diferencial de Síndromes Febris Suspeitos de Malária” a nível Nacional.

O Protocolo de Pesquisa foi previamente submetido ao Comité de Ética do Ministério da Saúde respeitando essencialmente as questões de consentimento informado, anonimato e protecção dos pacientes em termos de tratamento local dos casos simples e encaminhamento dos casos graves para os hospitais de referencia.

Nesta condição, o Dr. Nuno Miguel da Silva Marques está autorizado a proceder a recolha de material biológico, fazer o seu tratamento laboratorial e publicar os achados sempre em concordância com o Departamento Nacional de Controlo de Doenças.

Luanda, aos 28 de Novembro de 2011

O CHEFE DE DEPARTAMENTO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Filomeno Fortes'.

Professor Doutor Filomeno Fortes
(MD, MPH, Ph.D.)
Membro do Comité de Ética

Variáveis	TDR Malária Negativo (n = 237)	TDR Malária Positivo (n = 5)	p
Unidade Sanitária			0.065
Alto-Hama	35 (14.8%)	0 (0%)	
Bailundo	10 (4.2%)	1 (20%)	
Caála	56 (23.6%)	0 (0%)	
Calenga	34 (14.3%)	0 (0%)	
Casseque	63 (26.6%)	1 (20%)	
Chilume	9 (3.8%)	1 (20%)	
Mineira	30 (12.7%)	2 (40%)	
Sexo			0.161
Masculino	93 (39.2%)	4 (80%)	
Feminino	144 (60.8%)	1 (20%)	
Gravidez			>0.999
Não	130 (90.3%)	1 (100%)	
Sim	14 (9.7%)	0 (0%)	
Idade	15.92 (± 16.946)	21 (± 16.538)	0.291
Escolaridade			>0.999
Analfabeto	35 (29.4%)	1 (33.3%)	
Primária	62 (52.1%)	1 (33.3%)	
Secundária / Superior	22 (18.5%)	1 (33.3%)	
Duração da febre (dias)	4.24 (±5.619)	2.8 (±0.837)	0.833
Temperatura à admissão			0.676
Apirexia	161 (67.9%)	4 (80%)	
Febre	76 (32.1%)	1 (20%)	
Viagens			0.017
Sim	9 (3.8%)	2 (40%)	
Não	228 (96.2%)	3 (60%)	

Vacina febre amarela				0.37
Sim	117 (50.2%)	1 (20%)		
Não	116 (49.8%)	4 (80%)		
Palidez cutâneo-mucosa				0.139
Não	206 (86.9%)	3 (60%)		
Sim	31 (13.1%)	2 (40%)		
Sufusão Conjuntival				>0.999
Não	233 (98.3%)	5 (100%)		
Sim	4 (1.7%)	0 (0%)		
Mialgias				0.032
Não	167 (70.5%)	1 (20%)		
Sim	70 (29.5%)	4 (80%)		
Artralgias				0.34
Não	158 (66.7%)	2 (40%)		
Sim	79 (33.3%)	3 (60%)		
Cefaleias				0.419
Não	141 (59.5%)	4 (80%)		
Sim	96 (40.5%)	1 (20%)		
Dores retro-oculares				>0.999
Não	234 (98.7%)	5 (100%)		
Sim	3 (1.3%)	0 (0%)		
Dores abdominais				>0.999
Não	151 (63.7%)	3 (60%)		
Sim	86 (36.3%)	2 (40%)		
Astenia				0.396
Não	215 (90.7%)	4 (80%)		
Sim	22 (9.3%)	1 (20%)		
Anorexia				0.594
Não	182 (76.8%)	3 (60%)		
Sim	55 (23.2%)	2 (40%)		
Náuseas				0.367
Não	217 (91.6%)	4 (80%)		
Sim	20 (8.4%)	1 (20%)		

Vómitos				0.594
	Não	197 (83.1%)	5 (100%)	
	Sim	40 (16.9%)	0 (0%)	
Diarreia				0.348
	Não	181 (90.5%)	5 (100%)	
	Sim	56 (23.6%)	0 (0%)	
Corrimento nasal				0.371
	Não	121 (51.1%)	4 (80%)	
	Sim	116 (48.9%)	1 (20%)	
Dispneia				>0.999
	Não	229 (96.6%)	5 (100%)	
	Sim	8 (3.4%)	0 (0%)	
Tosse				>0.999
	Não	93 (39.2%)	2 (40%)	
	Sim	144 (60.8%)	3 (60%)	
Exantema				>0.999
	Sim	9 (3.8%)	0 (0%)	
	Não	228 (96.2%)	5 (100%)	
Prurido				>0.999
	Não	232 (97.9%)	5 (100%)	
	Sim	5 (2.1%)	0 (0%)	
Hemorragias				> 0.999
	Não	230 (97%)	5 (100%)	
	Sim	7 (3%)	0 (0%)	
Antibioterapia				0.602
	Sim	33 (13.9%)	0 (0%)	
	Não	204 (86.1%)	5 (100%)	
Malária últimos 3 meses				> 0.999
	Não	198 (83.5%)	4 (80%)	
	Sim	39 (16.5%)	1 (20%)	
Febre últimos 3 meses				> 0.999
	Não	187 (78.9%)	4 (80%)	
	Sim	50 (21.1%)	1 (20%)	

Mosquiteiro última noite			0.656
Não	103 (43.5%)	3 (60%)	
Sim	134 (56.5%)	2 (40%)	
Número de mosquiteiros			0.63
0	84 (35.4%)	2 (40%)	
1	89 (37.6%)	3 (60%)	
2	40 (16.9%)	0 (0%)	
3 ou mais	24 (10.1%)	0 (0%)	
Tipo de moradia			0.073
Cimento	21 (8.9%)	2 (40%)	
Adobe	216 (91.1%)	3 (60%)	
Insecticidas domiciliares			> 0.999
Sim	92 (38.8%)	2 (40%)	
Não	145 (61.2%)	3 (60%)	
Número de divisões	3.66 (± 1.666)	4.8 (± 3.033)	0.459
Agregado familiar	5.63 (± 2.332)	5.6 (± 1.817)	0.983
Casa de banho / Latrina			> 0.999
Sim	232 (97.9%)	5 (100%)	
Não	5 (2.1%)	0 (0%)	
Água armazenada casa			0.025
Não	33 (13.9%)	3 (60%)	
Sim	204 (86.1%)	2 (40%)	
Água canalizada			> 0.999
Sim	25 (10.5%)	1 (20%)	
Não	212 (89.5%)	4 (80%)	
Origem da água			0.383
Cacimba	119 (50.2%)	4 (80%)	
Chafariz	46 (19.4%)	0 (0%)	
Rede pública	26 (11%)	1 (20%)	
Rio	43 (18.1%)	0 (0%)	
Tanque	3 (1.3%)	0 (0%)	
Rede de esgoto			> 0.999

	Não	228 (96.2%)	5 (100%)	
	Sim	9 (3.8%)	0 (0%)	
Luz geral / gerador				> 0.999
	Sim	119 (50.2%)	3 (60%)	
	Não	118 (49.8%)	2 (40%)	
Animais domésticos				0.161
	Sim	144 (60.8%)	1 (20%)	
	Não	93 (39.2%)	4 (80%)	
Actividades no rio				> 0.999
	Não	167 (70.5%)	4 (80%)	
	Sim	70 (29.5%)	1 (20%)	
Actividades agrícolas				> 0.999
	Não	99 (41.8%)	2 (40%)	
	Sim	138 (58.2%)	3 (60%)	
TDR Dengue				> 0.999
	Negativo	235 (99.2%)	5 (100%)	
	Positivo	2 (0.8%)	0 (0%)	
TDR Chikungunya				> 0.999
	Negativo	233 (98.3%)	5 (100%)	
	Positivo	4 (1.7%)	0 (0%)	
Microscopia óptica				< 0.001
	Negativa	190 (83.7%)	0 (0%)	
	Positiva	37 (16.3%)	5 (100%)	
Alta				0.097
	Sim	212 (89.5%)	3 (60%)	
	Não	25 (10.5%)	2 (40%)	

Tabela A: Caracterização da subamostra com TDR positivo para malária na província do Huambo.

Variáveis	TDR Chikungunya Negativo (n = 238)	TDR Chikungunya Positivo (n = 4)	p
Unidade Sanitária			0.216
Alto Hama	35 (14.7%)	0 (0%)	
Bailundo	11 (4.6%)	0 (0%)	
Caála	56 (23.5%)	0 (0%)	
Calenga	34 (14.3%)	0 (0%)	
Casseque	62 (26.1%)	2 (50%)	
Chilume	10 (4.2%)	0 (0%)	
Mineira	30 (12.6%)	2 (50%)	
Sexo			0.651
Masculino	96 (40.3%)	1 (25%)	
Feminino	142(59.7%)	3 (75%)	
Gravidez			0.264
Não	129 (90.8%)	2 (66.7%)	
Sim	13 (9.2%)	1 (33.3%)	
Trimestre da gravidez			>0.999
1	8 (53.8%)	1 (100%)	
2	3 (23.1%)	0 (0%)	
3	3 (23.1%)	0 (0%)	
Idade	16.01 (± 17.029)	16.75 (± 9.323)	0.665
Escolaridade			0.585
Analfabeto	36 (30.3%)	0 (0%)	
Primária	61 (51.3%)	2 (66.7%)	
Secundária / Superior	22 (18.5%)	1 (33.3%)	
Duração da febre (dias)	4.21 (±5.608)	4.5 (±1.915)	0.164
Temperatura à admissão			0.594
Apirexia	163 (68.5%)	2 (50%)	
Febre	75 (31.5%)	2 (50%)	
Viagens			>0.999

	Sim	11 (4.6%)	0 (0%)	
	Não	227 (95.4%)	4 (100%)	
Vacina febre amarela				0.622
	Sim	117 (50%)	1 (25%)	
	Não	117 (50%)	3 (75%)	
Palidez cutâneo-mucosa				0.645
	Não	205 (86.1%)	4 (100%)	
	Sim	33 (13.9%)	0 (0%)	
Sufusão Conjuntival				>0.999
	Não	234 (98.3%)	4 (100%)	
	Sim	4 (1.7%)	0 (0%)	
Mialgias				>0.999
	Não	167 (70.5%)	1 (20%)	
	Sim	70 (29.5%)	4 (80%)	
Artralgias				0.606
	Não	158 (66.4%)	2 (50%)	
	Sim	80 (33.6%)	2 (50%)	
Cefaleias				0.651
	Não	142 (59.7%)	3 (75%)	
	Sim	96 (40.3%)	1 (25%)	
Dores retro-oculares				>0.999
	Não	235 (98.7%)	4 (100%)	
	Sim	3 (1.3%)	0 (0%)	
Dores abdominais				0.623
	Não	152 (63.9%)	2 (50%)	
	Sim	86 (36.1%)	2 (50%)	
Astenia				>0.999
	Não	215 (90.3%)	4 (100%)	
	Sim	23 (9.7%)	0 (0%)	
Anorexia				>0.999
	Não	182 (76.5%)	3 (75%)	
	Sim	56 (23.5%)	1 (25%)	

Náuseas				0.306
	Não	218 (91.6%)	3 (75%)	
	Sim	20 (8.4%)	1 (25%)	
Vômitos				0.612
	Não	198 (83.2%)	4 (100%)	
	Sim	40 (16.8%)	0 (0%)	
Diarreia				>0.999
	Não	183 (76.9%)	3 (75%)	
	Sim	55 (23.1%)	1 (25%)	
Diarreia com sangue				>0.999
	Não	50 (90.9%)	1 (100%)	
	Sim	5 (9.1%)	0 (0%)	
Diarreia com muco				>0.999
	Não	25 (45.5%)	0 (0%)	
	Sim	30 (54.5%)	1 (100%)	
Corrimento nasal				>0.999
	Não	123 (51.7%)	2 (50%)	
	Sim	115 (48.3%)	2 (50%)	
Dispneia				>0.999
	Não	230 (96.6%)	4 (100%)	
	Sim	8 (3.4%)	0 (0%)	
Tosse				>0.999
	Não	93 (39.1%)	2 (50%)	
	Sim	145 (60.9%)	2 (50%)	
Exantema				>0.999
	Não	229 (96.2%)	4 (100%)	
	Não	9 (3.8%)	0 (0%)	
Prurido				>0.999
	Não	233 (97.9%)	4 (100%)	
	Sim	5 (2.1%)	0 (0%)	
Hemorragias				> 0.999
	Não	231 (97.1%)	4 (100%)	
	Sim	7 (2.9%)	0 (0%)	

Antibiototerapia				0.624
	Sim	33 (13.9%)	0 (0%)	
	Não	205 (86.1%)	4 (100%)	
Malária últimos 3 meses				0.612
	Não	198 (83.2%)	4 (100%)	
	Sim	40 (16.8%)	0 (0%)	
Febre últimos 3 meses				0.582
	Não	187 (78.6%)	4 (100%)	
	Sim	51 (21.4%)	0 (0%)	
Mosquiteiro última noite				> 0.999
	Sim	134 (56.3%)	2 (50%)	
	Não	104 (43.7%)	2 (50%)	
Número de mosquiteiros				0.746
	0	84 (35.3%)	2 (50%)	
	1	90 (37.8%)	2 (50%)	
	2	40 (16.8%)	0 (0%)	
	3 ou mais	24 (10.1%)	0 (0%)	
Tipo de moradia				0.331
	Cimento	22 (9.2%)	1 (25%)	
	Adobe	216 (90.8%)	3 (75%)	
Repelentes domiciliares				> 0.999
	Não	146 (61.3%)	2 (50%)	
	Sim	92 (38.7%)	2 (50%)	
Nº divisões		3.69 (± 1.712)	3.25 (± 0.957)	0.763
Agregado familiar		5.63 (± 2.334)	5.5 (± 1.291)	0.976
Casa de banho / Latrina				> 0.999
	Sim	233 (97.9%)	4 (100%)	
	Não	5 (2.1%)	0 (0%)	

Água armazenada casa			> 0.999
Não	35 (14.7%)	1 (25%)	
Sim	203 (85.3%)	3 (75%)	
Água canalizada			0.058
Sim	24 (10.1%)	2 (50%)	
Não	214 (89.9%)	2 (50%)	
Origem da água			0.143
Cacimba	121 (50.8%)	2 (50%)	
Chafariz	46 (19.3%)	0 (0%)	
Rede pública	26 (10.5%)	2 (50%)	
Rio	43 (18.1%)	0 (0%)	
Tanque de água	3 (1.3%)	0 (0%)	
Rede de esgoto			0.141
Sim	8 (3.4%)	1 (25%)	
Não	230 (96.6%)	3 (75%)	
Luz geral / gerador			0.622
Sim	119 (50%)	3 (75%)	
Não	119 (50%)	1 (25%)	
Animais domésticos			0.651
Não	96 (40.3%)	1 (25%)	
Sim	142 (59.7%)	3 (75%)	
Actividades no rio			> 0.999
Não	168 (70.6%)	3 (75%)	
Sim	70 (29.4%)	1 (25%)	
Actividades agrícolas			0.311
Não	98 (41.2%)	3 (75%)	
Sim	140 (58.8%)	1 (25%)	
TDR Dengue			0.033
Negativo	237 (99.6%)	3 (75%)	
Positivo	1 (0.4%)	1 (25%)	
TDR Malária			> 0.999

	Negativo	233 (97.9%)	4 (100%)	
	Positivo	5 (2.1%)	0 (0%)	
Microscopia óptica				0.598
	Negativa	186 (81.6%)	4 (100%)	
	Positiva	42 (18.4%)	0 (0%)	
Alta				> 0.999
	Sim	211 (88.7%)	4 (100%)	
	Não	27 (11.3%)	0 (0%)	

Tabela B: Caracterização da subamostra com TDR positivo para chikungunya na província do Huambo.

	Negativo (n = 190)	Positivo (n = 110)	p
Unidade Sanitária			0.093
Senje	29 (15.3%)	25 (22.7%)	
Catumbela	60 (31.6%)	40 (36.4%)	
Chongoroi	101 (53.2%)	45 (40.9%)	
Sexo			0.05
Masculino	66 (34.7%)	51 (46.4%)	
Feminino	124 (65.3%)	59 (53.6%)	
Grávida			0.149
Não	111 (89.5%)	57 (96.6%)	
Sim	13 (10.5%)	2 (3.4%)	
Idade	21.135 (± 18.351)	15.22 2 (± 16.174)	0.039
Escolaridade			0.513
Analfabeto	38 (29.2%)	22 (31.0%)	
Primária	67 (51.5%)	40 (56.3%)	
Secundária / Superior	25 (19.3%)	9 (12.7%)	
Município			0.161

Benguela	3 (1.6%)	0 (0%)	
Catumbela	43 (22.6%)	35 (31.8%)	
Chongoroi	127 (66.8%)	70 (63.6%)	
Lobito	15 (7.9%)	5 (4.5%)	
Quilengues	2 (1.1%)	0(0%)	
Duração da febre (dias)	4.64 (±4.419)	4.2 (±3.472)	0.726
Temperatura à admissão	36.533 (±0.817)	37.02 (±1.184)	< 0.001
Viagens			0.612
Sim	12 (6.3%)	5 (4.5%)	
Não	178 (93.7%)	105 (95.5%)	
Palidez cutâneo-mucosa			0.005
Não	160 (84.2%)	77 (70%)	
Sim	30 (15.8%)	33 (30%)	
Sufusão Conjuntival			0.656
Não	186 (97.9%)	109 (99.1%)	
Sim	4 (2.1%)	1 (0.9%)	
Mialgias			0.002
Não	91 (47.9%)	74 (67.3%)	
Sim	99 (52.1%)	36 (32.7%)	
Artralgias			0.005
Não	96 (50.5%)	74 (67.3%)	
Sim	94 (49.5%)	36 (32.7%)	
Cefaleias			0.005
Não	103 (54.2%)	38 (34.5%)	
Sim	87 (45.8%)	72 (65.5%)	
Dores retro-oculares			>0.999
Não	187 (98.4%)	109 (99.1%)	
Sim	3 (1.6%)	1 (0.9%)	
Dores abdominais			0.002
Não	130	55 (50%)	

		(68.4%)	
	Sim	60 (31.6%)	55 (50%)
Astenia			0.059
	Não	169 (88.9%)	89 (80.9%)
	Sim	21 (11.1%)	21 (19.1%)
Anorexia			>0.999
	Não	182 (95.8%)	105 (95.5%)
	Sim	8 (4.2%)	5 (4.5%)
Náuseas			>0.999
	Não	179 (94.2%)	103 (93.6%)
	Sim	11 (5.8%)	7 (6.4%)
Vômitos			0.640
	Não	178 (93.7%)	101 (91.8%)
	Sim	12 (6.3%)	9 (8.2%)
Diarreia			0.272
	Não	172 (90.5%)	104 (94.5%)
	Sim	18 (9.5%)	6 (5.5%)
Diarreia com sangue			0.078
	Não	2 (11.1%)	3 (50%)
	Sim	16 (88.9%)	3 (50%)
Diarreia com muco			0.250
	Não	18 (100%)	5 (83.3%)
	Sim	0 (0%)	1 (16.7%)
Corrimento nasal			0.005
	Não	150 (78.9%)	101 (91.8%)
	Sim	40 (21.1%)	9 (8.2%)
Dispneia			0.006
	Não	190 (100%)	105 (95.5%)
	Sim	0 (0%)	5 (4.5%)
Tosse			0.009
	Não	130 (68.4%)	91 (82.7%)
	Sim	60 (31.6%)	19 (17.3%)

Exantema			0,420
Não	185 (97.4%)	109 (99.1%)	
Sim	5 (2.6%)	1 (0.9%)	
Obnubilação			0,034
Não	184 (96.8%)	100 (90.9%)	
Sim	6 (3.2%)	10 (9.1%)	
Hemorragias			> 0.999
Não	186 (97.9%)	108 (98.2%)	
Sim	4 (2.1%)	2 (1.8%)	
Hepatomegália			0.001
Não	184 (96.8%)	95 (86.4%)	
Sim	6 (3.2%)	15 (13.6%)	
Esplenomegália			0.002
Não	184 (96.8%)	96 (87.3%)	
Sim	6 (3.2%)	14 (12.7%)	
Antibioterapia			0.106
Sim	4 (2.1%)	7 (6.4%)	
Não	186 (97.9%)	103 (93.6%)	
Malária nos últimos 3 meses			0.121
Não	176 (92.6%)	107 (97.3%)	
Sim	14 (7.4%)	3 (2.7%)	
Febre nos últimos 3 meses			0.106
Não	174 (91.6%)	106 (96.4%)	
Sim	16 (8.4%)	4 (3.6%)	
Mosquiteiro última noite			0.019
Não	142 (74.7%)	95 (86.4%)	
Sim	48 (25.3%)	15 (13.6%)	
Número de mosquiteiros			0.176
0	124 (65.3%)	84 (77.1%)	

1	45 (23.7%)	17 (15.6%)	
2	16 (8.4%)	7 (6.4%)	
3 ou mais	5 (2.6%)	1 (0.9%)	
Transfusão de sangue			0.429
Não	187 (98.4%)	106 (96.4%)	
Sim	3 (1.6%)	4 (3.6%)	
Tipo de habitação			0.003
Alvenaria	60 (31.6%)	17 (15.5%)	
Adobe	66 (34.7%)	38 (34.5%)	
Pau a pique + Chapa com capim	64 (33.7%)	55 (50.0%)	
Número de divisões	2.82 (±1.679)	2.35 (±1.634)	0.001
Agregado familiar	6.07 (±3.246)	6.04 (±2.702)	0.542
Casa de banho / Latrina			0.001
Sim	103 (54.2%)	37 (33.6%)	
Não	87 (45.8%)	73 (66.4%)	
Água armazenada casa			0.015
Não	72 (37.9%)	26 (23.6%)	
Sim	118 (62.1%)	84 (76.4%)	
Água canalizada			0.016
Sim	73 (38.4%)	27 (24.5%)	
Não	117 (61.6%)	83 (75.5%)	
Rede de esgoto			0.010
Sim	69 (36.3%)	24 (21.8%)	
Não	121 (63.7%)	86 (78.2%)	
Origem água			0.116
Rede pública	74 (38.9%)	28 (25.5%)	
Chafariz	49 (25.8%)	33 (30.0%)	
Rio	53 (27.9%)	43 (39.1%)	

Cacimba	12 (6.3%)	5 (4.5%)	
Tanque	2 (1.1%)	1 (0.9%)	
Luz geral / gerador			0.006
Sim	83 (43.7%)	30 (27.3%)	
Não	107 (56.3%)	80 (72.7%)	
Ar condicionado			0.055
Sim	8 (4.2%)	0 (0%)	
Não	182 (95.8%)	110 (100.0%)	
Animais domésticos			0.269
Não	79 (41.6%)	38 (34.5%)	
Sim	111 (58.4%)	72 (65.5%)	
Actividades recreativas no rio			0.006
Não	118 (62.1%)	50 (45.5%)	
Sim	72 (37.9%)	60 (54.5%)	
Microscopia óptica			< 0.001
Negativa	176 (98.9%)	6 (7.4%)	
Positiva	2 (1.1%)	75 (92.6%)	
TDR Dengue			> 0.999
Negativo	184 (96.8%)	106 (96.4%)	
Positivo	6 (3.2%)	4 (3.6%)	
TDR Chikungunya			0.020
Negativo	163 (85.8%)	82 (74.5%)	
Positivo	27 (14.2%)	28 (25.5%)	
Valor de Hemoglobina	9.733 (± 1.728)	9.296 (± 2.736)	0.363
Anemia			0.468
Não	7 (16.3%)	2 (8.0%)	
Sim	36 (83.7%)	23 (92.0%)	
Alta			0.002
Sim	185 (97.4%)	97 (88.2%)	
Não	5 (2.6%)	13 (11.8%)	

Tabela C: Caracterização da subamostra com TDR positivo para malária na província de Benguela.

	Negativo (n = 245)	Positivo (n = 55)	p
Unidade Sanitária			0.612
Senje	46 (18.8%)	8 (14.5%)	
Catumbela	79 (32.2%)	21 (38.2%)	
H.M.Chongoroi	120 (49.0%)	26 (47.3%)	
Sexo			0.359
Masculino	99 (40.4%)	18 (32.7%)	
Feminino	146 (59.6%)	37 (67.3%)	
Grávida			> 0.999
Não	134 (91.8%)	34 (91.9%)	
Sim	12 (8.2%)	3 (8.1%)	
Idade	16.777 (± 17.026)	28.72 (± 17.979)	< 0.001
Escolaridade			0.002
Analfabeto	41 (27.3%)	19 (37.3%)	
Primária	90 (60.0%)	17 (33.3%)	
Secundária / Superior	19 (12.7%)	15 (29.4%)	
Município			0.067
Benguela	1 (0.4%)	2 (3.6%)	
Catumbela	65 (26.5%)	13 (23.6%)	
Chongoroi	164 (66.9%)	33 (60.0%)	
Lobito	13 (5.3%)	7 (12.7%)	
Quilengues	2 (0.8%)	0 (0%)	
Duração da febre (dias)	4.33 (± 4.041)	5.11 (± 4.315)	0.006
Temperatura à admissão	36.740 (± 0.994)	36.582 (± 0.994)	0.152
Viagens			0.098
Não	234 (95.5%)	49 (89.6%)	
Sim	11 (4.5%)	6 (10.9%)	
Palidez cutâneo-mucosa			0.103
Não	189 (77.1%)	48 (87.3%)	
Sim	56 (22.9%)	7 (12.7%)	
Sufusão Conjuntival			> 0.999
Não	241 (98.4%)	54 (98.2%)	
Sim	4 (1.6%)	1 (1.8%)	
Mialgias			< 0.001
Não	151 (61.6%)	14 (25.5%)	
Sim	94 (38.4%)	41 (74.5%)	
Artralgias			< 0.001
Não	157 (64.1%)	13 (23.6%)	
Sim	88 (35.9%)	42 (76.4%)	
Cefaleias			0.100

	Não	121 (49.4%)	20 (36.4%)	
	Sim	124 (50.6%)	35 (63.6%)	
Dores retro-oculares				0.597
	Não	241 (98.4%)	55 (100.0%)	
	Sim	4 (1.6%)	0 (0%)	
Dores abdominais				0.014
	Não	143 (58.4%)	42 (76.4%)	
	Sim	102 (41.6%)	13 (23.6%)	
Astenia				0.289
	Não	208 (84.9%)	50 (90.9%)	
	Sim	37 (15.1%)	5 (9.1%)	
Anorexia				> 0.999
	Não	234 (95.5%)	53 (96.4%)	
	Sim	11 (4.5%)	2 (3.6%)	
Náuseas				> 0.999
	Não	230 (93.9%)	52 (94.5%)	
	Sim	15 (6.1%)	3 (5.5%)	
Vômitos				> 0.999
	Não	228 (93.1%)	51 (92.7%)	
	Sim	17 (6.9%)	4 (7.3%)	
Diarreia				0.094
	Não	222 (90.6%)	54 (98.2%)	
	Sim	23 (9.4%)	1 (1.8%)	
Diarreia com sangue				0.208
	Não	19 (82.6%)	0 (0%)	
	Sim	4 (17.4%)	1 (100.0%)	
Diarreia com muco				> 0.999
	Não	22 (95.7)	1 (100.0%)	
	Sim	1 (4,3%)	0 (0%)	
Corrimento nasal				0.008
	Não	198 (80.8%)	53 (96.4%)	
	Sim	47 (19.2%)	2 (3.6%)	
Dispneia				> 0.999
	Não	241 (98.4%)	54 (98.2%)	
	Sim	4 (1.6%)	1 (1.8%)	
Tosse				0.017
	Não	173 (70.6%)	48 (87.3%)	
	Sim	72 (29.4%)	7 (12.7%)	
Exantema				0.371
	Não	239 (97.6%)	55 (100.0%)	
	Sim	6 (2.4%)	0 (0%)	
Obnubilação				> 0.999
	Não	232 (94.7%)	52 (94.5%)	
	Sim	13 (5.3%)	3 (5.5%)	
Hemorragias				> 0.999

	Não	240 (98.0%)	54 (98.2%)	
	Sim	5 (2.0%)	1 (1.8%)	
Hepatomegalia				0.557
	Não	229 (93.5%)	50 (90.9%)	
	Sim	16 (6.5%)	5 (9.1%)	
Esplenomegalia				> 0.999
	Não	229 (93.5%)	51 (92.7%)	
	Sim	16 (6.5%)	4 (7.3%)	
Antibioterapia				0.226
	Não	238 (97.1%)	51 (92.7%)	
	Sim	7 (2.9%)	4 (7.3%)	
Malária nos últimos 3 meses				0.215
	Não	229 (93.5%)	54 (98.2%)	
	Sim	16 (6.5%)	1 (1.8%)	
Febre nos últimos 3 meses				0.390
	Não	227 (92.7%)	53 (96.4%)	
	Sim	18 (7.3%)	2 (3.6%)	
Mosquiteiro última noite				0.464
	Não	49 (20.0%)	14 (25.5%)	
	Sim	196 (80.0%)	41 (74.5%)	
Número de Mosquiteiros				0.084
	0	172 (70.5%)	36 (65.5%)	
	1	46 (18.9%)	16 (29.1%)	
	2	22 (9.0%)	1 (1.8%)	
	3 ou mais	4 (1.6%)	2 (3.6%)	
Transusão de sangue				0.616
	Não	240 (98.0%)	53 (96.4%)	
	Sim	5 (2.0%)	2 (3.6%)	
Tipo de habitação				0.811
	Alvenaria	61 (24.9%)	16 (29.1%)	
	Adobe	87 (35.5%)	17 (30.9%)	
	Chapa com capim	2 (0.8%)	1 (1.8%)	
	Pau a pique	95 (38.8%)	21 (38.2%)	
Número de divisões		2.67 (± 1.622)	2.55 (± 1.903)	0.146
Agregado familiar		6.18 (± 3.009)	5.51 (± 3.214)	0.081
Casa de banho / Latrina				0.765
	Sim	113 (46.1%)	27 (49.1%)	
	Não	132 (53.9%)	28 (50.9%)	
Água armazenada casa				0.207
	Não	76 (31.0%)	22 (40.0%)	
	Sim	169 (69.0%)	33 (60.0%)	
Água canalizada				0.430

	Sim	79 (32.2%)	21 (38.2%)	
	Não	166 (67.8%)	34 (61.8%)	
Rede de esgoto				0.872
	Sim	75 (30.6%)	18 (32.7%)	
	Não	170 (69.4%)	37 (67.3%)	
Origem da água				0.716
	Rede pública	80 (32.7%)	22 (40.0%)	
	Chafariz	67 (27.3%)	15 (27.3%)	
	Rio	81 (33.1%)	15 (27.3%)	
	Cacimba	15 (6.1%)	2 (3.6%)	
	Tanque	2 (0.8%)	1 (1.8%)	
Luz geral / gerador				0.539
	Sim	90 (36.7%)	23 (41.8%)	
	Não	155 (63.3%)	32 (58.2%)	
Ar condicionado				0.165
	Sim	5 (2.0%)	3 (5.5%)	
	Não	240 (98.0%)	52 (94.5%)	
Animais domésticos				0.649
	Não	94 (38.4%)	23 (41.8%)	
	Sim	151 (61.6%)	32 (58.2%)	
Actividades recreativas no rio				0.370
	Não	134 (54.7%)	34 (61.8%)	
	Sim	111 (45.3%)	21 (38.2%)	
Microscopia óptica				0.365
	Negativa	154 (71.6%)	28 (63.6%)	
	Positiva	61 (28.4%)	16 (36.4%)	
TDR Malária				0.020
	Negativo	163 (66.5%)	27 (49.1%)	
	Positivo	82 (33.5%)	28 (50.9%)	
TDR Dengue				> 0.999
	Negativo	237 (96.7%)	53 (96.4%)	
	Positivo	8 (3.3%)	2 (3.6%)	
Valor de hemoglobina				0.090
		9.436 (± 2.188)	10.36 (± 1.761)	
Anemia				> 0.999
	Não	8 (13.8%)	1 (10.0%)	
	Sim	50 (86.2%)	9 (90.0%)	
Alta				> 0.999
	Sim	230 (93.9%)	52 (94.5%)	
	Não	15 (6.1%)	3 (5.5%)	

Tabela D: Caracterização da subamostra com TDR positivo para chikungunya na província de Benguela.

		Negativo (n = 290)	Positivo (n = 10)	p
Unidade Sanitária				0.529
	Senje	53 (18.3%)	1 (10.0%)	
	Catumbela	95 (32.8%)	5 (50.0%)	
	Chongoroi	142 (49.0%)	4 (40.0%)	
Sexo				0.326
	Masculino	115 (39.7%)	2 (20.0%)	
	Feminino	175 (60.3%)	8 (80.0%)	
Grávida				0.629
	Não	160 (91.4%)	8 (100.0%)	
	Sim	15 (8.6%)	0 (0%)	
Idade		18.476 (± 17.472)	33.200 (± 21.806)	0.023
Escolaridade				0.026
	Analfabeto	55 (28.6%)	5 (55.6%)	
	Primária	106 (55.2%)	1 (11.1%)	
	Secundária / Superior	31 (16.1%)	3 (33.3%)	
Município				0.347
	Benguela	3 (1.0%)	0 (0%)	
	Catumbela	75 (25.9%)	3 (30.0%)	
	Chongoroi	192 (62.2%)	5 (50.0%)	
	Lobito	18 (6.2%)	2 (20.0%)	
	Quilengues	2 (0.7%)	0 (0%)	
Duração da febre (dias)		4.44 (±4.114)	5.60 (±3.534)	0.103
Temperatura à admissão		36.704 (±0.996)	36.920 (±0.971)	0.263
Viagens				0.104
	Não	275 (94.8%)	8 (80.0%)	
	Sim	15 (5.2%)	2 (20.0%)	
Palidez cutâneo-mucosa				0.478
	Não	228 (78.6%)	9 (90.0%)	
	Sim	62 (21.4%)	1 (10.0%)	
Sufusão Conjuntival				> 0.999
	Não	285 (98.3%)	10 (100.0%)	
	Sim	5 (1.7%)	0 (0%)	
Mialgias				0.047
	Não	163 (56.2%)	2 (20.0%)	
	Sim	127 (43.8%)	8 (80.0%)	
Artralgias				0.003
	Não	169 (58.3%)	1 (10.0%)	
	Sim	121 (41.7%)	9 (90.0%)	
Cefaleias				0.344

	Não	138 (47.6%)	3 (30.0%)
	Sim	152 (52.4%)	7 (70.0%)
Dores retro-oculares			> 0.999
	Não	286 (98.6%)	10 (100.0%)
	Sim	4 (1.4%)	0 (0%)
Dores abdominais			0.746
	Não	178 (61.4%)	7 (70.0%)
	Sim	112 (38.6%)	3 (30.0%)
Astenia			0.037
	Não	252 (86.9%)	6 (60.0%)
	Sim	38 (13.1%)	4 (40.0%)
Anorexia			> 0.999
	Não	277 (95.5%)	10 (100.0%)
	Sim	13 (4.5%)	0 (0%)
Náuseas			0.648
	Não	272 (93.8%)	10 (100.0%)
	Sim	18 (6.2%)	0 (0%)
Vômitos			0.628
	Não	269 (92.8%)	10 (100.0%)
	Sim	21 (7.2%)	0 (0%)
Diarreia			0.615
	Não	266 (91.7%)	10 (100.0%)
	Sim	24 (8.3%)	0 (0%)
Corrimento nasal			0.706
	Não	242 (83.4%)	9 (90.0%)
	Sim	48 (16.6%)	1 (10.0%)
Dispneia			> 0.999
	Não	285 (98.3%)	10 (100.0%)
	Sim	5 (1.7%)	0 (0%)
Tosse			0.738
	Não	213 (73.4%)	8 (80.0%)
	Sim	77 (26.6%)	2 (20.0%)
Exantema			> 0.999
	Não	284 (97.9%)	10 (100.0%)
	Sim	6 (2.1%)	0 (0%)
Obnubilação			> 0.999
	Não	275 (94.8%)	9 (90.0%)
	Sim	15 (5.2%)	1 (10.0%)
Hemorragias			0.185
	Não	285 (98.3%)	9 (90.0%)
	Sim	5 (1.7%)	1 (10.0%)
Hepatomegália			> 0.999
	Não	270 (93.1%)	9 (90.0%)
	Sim	20 (6.9%)	1 (10.0%)
Esplenomegália			> 0.999

	Não	271 (93.4%)	9 (90.0%)	
	Sim	19 (6.6%)	1 (10.0%)	
Antibioterapia				> 0.999
	Sim	279 (96.2%)	10 (100.0%)	
	Não	11 (3.8%)	0 (0%)	
Malária nos últimos 3 meses				0.657
	Não	273 (94.1%)	10 (100.0%)	
	Sim	17 (5.9%)	0 (0%)	
Febre nos últimos 3 meses				0.634
	Não	270 (93.1%)	10 (100.0%)	
	Sim	20 (6.9%)	0 (0%)	
Mosquiteiro última noite				0.226
	Não	59 (20.3%)	4 (40.0%)	
	Sim	231 (79.7%)	6 (60.0%)	
Número de mosquiteiros				0.100
	0	203 (70.2%)	5 (50.0%)	
	1	60 (20.8%)	2 (20.0%)	
	2	21 (7.3%)	2 (20.0%)	
	3 ou mais	5 (1.7%)	1 (10.0%)	
Transusão de sangue				> 0.999
	Não	283 (97.6%)	10 (100.0%)	
	Sim	7 (2.4%)	0 (0%)	
Tipo de habitação				0.863
	Alvenaria	74 (25.5%)	3 (30.0%)	
	Adobe	100 (34.5%)	4 (40.0%)	
	Chapa com capim	3 (1.0%)	0 (0%)	
	Pau a pique	113 (39.0%)	3 (30.0%)	
Número de divisões				0.561
		2.4 (± 1.677)	2.8 (± 1.687)	
Agregado familiar				0.604
		6.08 (± 3.091)	5.4 (± 1.506)	
Casa de banho / Latrina				> 0.999
	Sim	135 (46.6%)	5 (50.0%)	
	Não	155 (53.4%)	5 (50.0%)	
Água armazenada casa				0.304
	Não	93 (32.1%)	5 (50.0%)	
	Sim	197 (67.9%)	5 (50.0%)	
Água canalizada				0.736
	Sim	96 (33.1%)	4 (40.0%)	
	Não	194 (66.9%)	6 (60.0%)	
Rede de esgoto				0.729
	Sim	89 (30.7%)	4 (40.0%)	
	Não	201 (69.3%)	6 (60.0%)	
Origem água				0.531

Rede pública	97 (33.4%)	5 (50.0%)	
Chafariz	81 (27.9%)	1 (10.0%)	
Rio	93 (32.1%)	3 (30.0%)	
Cacimba	16 (5.5%)	1 (10.0%)	
Tanque	3 (1.0%)	0 (0%)	
Luz geral / gerador			> 0.999
Sim	109 (37.6%)	4 (40.0%)	
Não	181 (62.4%)	6 (60.0%)	
Ar condicionado			0.240
Sim	7 (2.4%)	1 (10.0%)	
Não	283 (97.6%)	9 (90.0%)	
Animais domésticos			> 0.999
Não	113 (39.0%)	4 (40.0%)	
Sim	177 (61.0%)	6 (60.0%)	
Actividades recreativas no rio			> 0.999
Não	162 (55.9%)	6 (60.0%)	
Sim	128 (44.1%)	4 (40.0%)	
Microscopia óptica			> 0.999
Negativa	176 (70.4%)	6 (66.7%)	
Positiva	74 (29.6%)	3 (33.3%)	
TDR Malária			> 0.999
Negativo	184 (63.4%)	6 (60.0%)	
Positivo	106 (36.6%)	4 (40.0%)	
TDR Chikungunya			> 0.999
Negativo	237 (81.7%)	8 (80.0%)	
Positivo	53 (18.3%)	2 (20.0%)	
Valor de Hemoglobina	9.629 (\pm 2.131)	7.7 (\pm 2.404)	0.317
Anemia			> 0.999
Não	9 (13.6%)	0 (0%)	
Sim	57 (86.4%)	2 (100.0%)	
Alta			> 0.999
Sim	273 (94.1%)	9 (90.0%)	
Não	17 (5.9%)	1 (10.0%)	

Tabela E: Caracterização da subamostra com TDR positivo para dengue na província de Benguela.

	Doente nº 1	Doente nº 2	Doente nº 3
Unidade Sanitária	Senje	Catumbela	Catumbela
Sexo	Feminino	Feminino	Feminino
Gravidez	Ausente	Ausente	Ausente
Idade (anos)	26	58	20
Escolaridade	Analfabeta	Analfabeta	Secundária
Profissão	Camponesa	Camponesa	Estudante
Tipo habitação	Pau-a-pique	Adobe	Alvenaria
Número de divisões	2	2	7
Agregado familiar	5	5	7
Água armazenada	Sim	Sim	Não
Origem da água	Rio	Rio	Rede pública
Animais domésticos	Sim	Sim	Sim
Actividades rio	Sim	Sim	Não
Vacina febre amarela	Não	Não	Não
Malária últimos 3 meses	Não	Não	Não
Temperatura à admissão	36,6 °C	37 °C	36 °C
Duração da febre (dias)	2	4	2
Mialgias	Sim	Sim	Sim
Artralgias	Sim	Sim	Sim
Cefaleias	Sim	Sim	Sim
Dores abdominais	Não	Sim	Não
Exantema	Não	Não	Não
Microscopia óptica	Positiva	Positiva	Positiva

TDR chikungunya	Negativo	Negativo	Negativo
Alta para domicílio	Sim	Sim	Sim
Diagnóstico de alta	Malária + dengue	Malária + dengue	Malária + dengue

Tabela F: Caracterização dos casos com IgM detectável no TDR para dengue e com TDR positivo para malária na província de Benguela.

Doente nº 1	
Unidade Sanitária	Chongoroi
Sexo	Feminino
Gravidez	Ausente
Idade (anos)	2
Escolaridade	Não aplicável
Profissão	Não aplicável
Tipo habitação	Pau-a-pique
Número de divisões	1
Agregado familiar	4
Água armazenada	Sim
Origem da água	Rio
Animais domésticos	Sim
Actividades rio	Sim
Vacina febre amarela	Não
Malária últimos 3 meses	Não
Temperatura à admissão	39 °C
Duração da febre (dias)	7

Mialgias	Não
Artralgias	Não
Cefaleias	Não
Dores abdominais	Sim
Exantema	Não
Obnubilação	Sim
Hepatoesplenomegália	Sim
Microscopia óptica	Não efectuada
Alta para domicílio	Não
Diagnóstico de alta	Malária + dengue

Tabela G: Caracterização do caso com Ag NS1 detectável no TDR para dengue e com TDR positivo para malária na província de Benguela.